

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jasmina Turkalj

NAČINI PRIPRAVE I METODE KARAKTERIZACIJE

NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 18.05.2018. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Ivan Pepić, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof.dr.sc. Biljana Nigović, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. dr.sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstv.savj., PLIVA Hrvatska d.o.o.

Rad ima 67 listova.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na pristupačnosti, pomoći, vodstvu, strpljenju i stručnim savjetima vezanim uz izradu specijalističkog rada.

Veliko hvala odjelu Istraživanja i razvoja, Pliva Hrvatska d.o.o., što mi je omogućen upis Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova s ciljem profesionalnog razvoja.

Zahvaljujem i obitelji na strpljenju i podršci.

Hvala svim dragim ljudima, posebice mojim prijateljima i kolegama na potpori i optimizmu.

SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog specijalističkog rada je dati pregled dostupne literature koja opisuje načine pripreme nanokristala djelatne tvari s posebnim naglaskom na odabir načina pripreme ovisno o svojstvima djelatne tvari. U radu će se opisati metode karakterizacije nanokristala djelatne tvari s kojima se osigurava kvaliteta farmaceutskog proizvoda s djelatnom tvari u obliku nanokristala, poboljšava bioraspoloživost i djelotvornost te sigurnost primjene. Prikazat će se analitičke tehnike koje se primjenjuju za ispitivanje veličine i morfologije nanokristala djelatne tvari, površinskog naboja čestica, kristalnog oblika te promjene amorfnog u kristalni oblik, sedimentacije, kemijske stabilnosti, topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala.

Materijali i metode:

Istraživanje u okviru ovog specijalističkog rada uključuje detaljan pregled dostupne literature iz područja načina pripreme i metoda karakterizacije nanokristala djelatne tvari. Odabrani članci su kritički proučeni, izdvojeni su najvažniji rezultati, a na temelju istraženih podataka doneseni su relevantni zaključci.

Rezultati:

Odabir načina pripreme nanokristala djelatne tvari ovisi o svojstvima djelatne tvari, kao što su topljivost u vodenim i organskim otapalima, lipofilnost ($\log P$) te fizikalna i kemijska stabilnost (sklonost promjeni kristalnog oblika ili razgradnji). Metode karakterizacije nanokristala djelatnih tvari kojima se procjenjuje učinkovitost postupka pripreme, kao i stabilnost nanosuspenzija, obuhvaćaju ispitivanje veličine čestica, raspodjele veličine čestica i indeks polidisperzije, morfologije nanokristala, kristalni oblik, površinski naboj čestica, sedimentacije i redisperzibilnost nanosuspenzije, kemijske stabilnosti, topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala. U slučaju parenteralne

primjene nanosuspenzija dodatno se provodi i ispitivanje sterilnosti, prisutnost pirogena ili bakterijskih endotoksina.

Zaključak:

Svojstva djelatne tvari poput topljivosti, hidrofobnosti, fizikalne ili kemijske stabilnosti utječu na odabir načina pripreme nanokristala djelatne tvari. Razvoj pouzdanih i prikladnih metoda za karakterizaciju djelatnih tvari u obliku nanokristala, neizostavan su dio razvoja farmaceutskog proizvoda s nanokristalima djelatne tvari kako bi se osigurala kvaliteta proizvoda u postupku pripreme i tijekom skladištenja te poboljšala *in vivo* učinkovitost.

SUMMARY

Objectives:

The aim of this work is to describe preparation of drug nanocrystals, with emphasis on dependency of drug nanocrystal preparation to properties of the active substance. Methods of characterization of drug nanocrystals used to ensure appropriate quality of the drug product, improved *in vivo* behavior and drug efficacy and safety will be reviewed. Analytical techniques used for determination of particle size, particle size distribution and polydispersity index, particle morphology, zeta potential, crystallinity, sedimentation, chemical stability, solubility and drug dissolution rate will be described.

Materials and methods:

Available literature related to preparation of nanocrystals and methods of characterization was searched. The selected articles with the most relevant results are critically studied and conclusions will be brought based on searched information.

Results:

The method for the preparation of drug nanocrystals is chosen based on the properties of the active substance, such as solubility in aqueous and organic media, lipophilicity (log P), physical or chemical stability (polymorphic conversion or chemical degradation). Methods of characterization of drug nanocrystals like particle size, particle size distribution and polydispersity index, particle morphology, zeta potential, crystallinity, sedimentation and redispersion of nanosuspension, chemical stability, solubility and drug dissolution rate are used for evaluation of effectiveness of preparation and physical stability of drug nanocrystals. Additionally, parenteral nanosuspensions are tested for sterility, pyrogenicity and bacterial endotoxins.

Conclusion:

Properties of the active substance, such as solubility, hydrophobicity, physical or chemical stability, influence the selection of the method for the preparation of drug nanocrystals. Key factor in product

development is development of adequate methods of characterization of drug nanocrystals to ensure appropriate quality of the drug product during preparation and storage, as well as improved *in vivo* behavior.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA..... | 1 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 5 |
| 3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI..... | 6 |
| 3.1. Prednosti primjene nanokristala djelatnih tvari | 6 |
| 3.1.1. Oralna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala..... | 6 |
| 3.1.2. Parenteralna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala..... | 9 |
| 3.1.3. Oftalmička primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala..... | 10 |
| 3.1.4. Pulmonalna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala..... | 11 |
| 3.2. Nedostaci primjene nanokristala djelatnih tvari | 11 |
| 3.3. Priprava nanokristala djelatne tvari | 12 |
| 3.3.1. Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari | 13 |
| 3.3.1.1. Taloženje izazvano miješanjem otapala i antiotapala | 14 |
| 3.3.1.2. Taloženje u prisutnosti superkritičnog fluida..... | 15 |
| 3.3.1.3. Taloženje izazvano uklanjanjem otapala | 15 |
| 3.3.2. Metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari | 16 |
| 3.3.2.1. Vlažno mljevenje | 16 |
| 3.3.2.2. Visokotlačna homogenizacija | 17 |
| 3.3.3. Kombinirane metode | 18 |
| 4. RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Prednosti i nedostaci tehnologija pripreme nanokristala djelatne tvari | 20 |
| 4.2. Stabilizacija suspenzija nanokristala djelatnih tvari | 24 |

| | | |
|----------|--|----|
| 4.2.1. | Odabir stabilizatora | 27 |
| 4.2.2. | Prevođenje nanosuspenzija u čvrsto stanje | 29 |
| 4.2.3. | Fizikalna stabilnost..... | 31 |
| 4.2.4. | Kemijska stabilnost | 35 |
| 4.3. | Metode karakterizacije nanokristala djelatne tvari | 36 |
| 4.3.1. | Veličina i morfologija čestica..... | 36 |
| 4.3.2. | Površinski naboj čestica (zeta potencijal) | 40 |
| 4.3.3. | Izdvajanje faza i redisperzibilnost..... | 40 |
| 4.3.4. | Kristalni oblik..... | 41 |
| 4.3.5. | Kemijska stabilnost | 43 |
| 4.3.6. | Topljivost | 43 |
| 4.3.7. | <i>In vitro</i> metode za ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari iz oblika nanokristala | 47 |
| 4.3.7.1. | Metode uzorkovanja i odjeljivanja..... | 48 |
| 4.3.7.2. | Metode s protočnim ćelijama..... | 50 |
| 4.3.7.3. | Metode dijalize..... | 51 |
| 4.3.7.4. | Kombinirane metode..... | 52 |
| 5. | ZAKLJUČAK | 55 |
| 6. | LITERATURA | 57 |
| 7. | ŽIVOTOPIS | 66 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Sve veći broj novootkrivenih lijekova su slabo topljive tvari, što ujedno znači i nisku i varijabilnu bioraspoloživost (1). Bioraspoloživost je osnovni farmakokinetički parametar djelatne tvari ili ljekovitog pripravka, a odnosi se na brzinu i opseg apsorpcije djelatne tvari u sistemsku cirkulaciju (2).

Kako bi se prevladao problem loše topljivosti, ovisno o svojstvima djelatne tvari (npr. topljivost, lipofilnost, talište, kemijska stabilnost) koriste se različiti načini za poboljšanje topljivosti, npr. stvaranje soli, ko-kristala ili kompleksa s ciklodekstrinima, upotreba surfaktanata ili ko-otapala, smanjenje veličine čestica ili modifikacija kristalnog oblika. Detaljan pregled načina poboljšanja topljivosti djelatnih tvari dao je Williams (3).

Problematiku loše topljivosti treba promatrati i s kinetičkog i s termodinamičkog aspekta. Drugim riječima, potrebno je odgovoriti na sljedeća pitanja: (i) koliko brzo se djelatna tvar može otapati pri danim uvjetima i (ii) koja je maksimalna količina tvari koja se može otopiti? Kinetički, brzina oslobađanja djelatne tvari ovisi o ukupnoj površini čestica i opisana je Noyes-Whitneyevom jednadžbom (4):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h}$$

gdje je:

dC/dt = brzina oslobađanja

A = površina čestica

D = koeficijent difuzije

C_s = zasićena topljivost

C = koncentracija lijeka u otopini u vremenu t

h = debljina difuzijskog sloja

Iz navedene jednadžbe proizlazi da se smanjenjem veličine čestica i povećanjem ukupne površine poveća i brzina oslobađanja.

Termodinamička topljivost tvari također ovisi o veličini čestica, a ta je ovisnost opisana Ostwald-Freundlichovom jednadžbom (5):

$$S = S_{\infty} \exp\left(\frac{2\gamma M}{r\rho RT}\right)$$

gdje je:

S = zasićena topljivost nanokristala djelatne tvari

S_{∞} = zasićena topljivost beskonačno velikog kristala djelatne tvari

γ = međupovršinska napetost kristala i medija

M = molekulska masa djelatne tvari

r = radijus čestice

ρ = gustoća

R = plinska konstanta

T = temperatura

Tradicionalnim načinima smanjenja veličine čestica (mikronizacijom mljevenjem kuglicama i sl.) postižu se veličine čestica djelatne tvari $> 1 \mu\text{m}$. Povećanje površine postignuto takvim procesima može poboljšati bioraspoloživost nekih tvari, ali nije dovoljno kako bi se značajno poboljšala brzina oslobađanja vrlo loše topljivih djelatnih tvari. Međutim, novijim tehnološkim postignućima danas je moguće smanjiti veličinu čestica na puno manje od $1 \mu\text{m}$, čime se značajno utječe na brzinu oslobađanja, čak i djelatnih tvari vrlo loše topljivosti. Na termodinamičku topljivost mikronizacija nema nikakav utjecaj, dok se kod nanosustava radi o poboljšanju od 10-15% za veličinu čestica 100 nm (5). S obzirom da se kod nanosustava brzina oslobađanja povećava značajno, stvara se efekt prezasićenosti, što eventualno može uzrokovati rekristalizaciju.

Osim povećanja topljivosti, submikronski sustavi pokazuju i svojstvo mukoadhezivnosti, odnosno bioadhezivnosti na mukozni sloj gastrointestinalnog trakta (6). Mucin je glikoprotein koji stvara vodonetopljivi viskozni gel na epitelnoj površini gastrointestinalnog trakta. Zbog šećernih skupina ima sveukupno anionski karakter.

Svojstvo mukoadhezivnosti nanokristalima djelatne tvari omogućava oslobađanje na određenom mjestu apsorpcije (tj. ciljano djelovanje) i dulje zadržavanje u gastrointestinalnom traktu, a time se stvara lokalno prezasićenje i koncentracijski gradijent otopljene tvari, što vodi do poboljšanja apsorpcije. Na oslobađanje i zadržavanje djelatne tvari se dodatno može utjecati modifikacijom površine nanočestica ugradnjom u mukoadhezivni polimer ili adsorpcijom kationskog polimera na površinu čestice, koji mogu ostvariti elektrostatske veze s negativno nabijenim mucinom. Tako su Müller i Jacobs (7) nanosuspenciju buparvakvona uklopili u hidrogel pripravljen od mukoadhezivnih polimera (različitih tipova Carbopol® i kitozana). Buparvakvon je loše topljiva tvar koja se koristi u terapiji gastrointestinalnog parazita *Cryptosporidium parvum*. Primjenjuje se oralno, a učinkovitost terapije ovom djelatnom tvari ovisi o vremenu zadržavanja u gastrointestinalnom traktu, zbog čega je ispitan utjecaj mukoadhezivnih polimera na fizikalna svojstva i stabilnost nanosuspencije. Autori su utvrdili da ugradnjom u hidrogel ne dolazi do promjena fizikalnih svojstava nanosuspencije (veličina čestica, PDI, zeta potencijal), kao niti skladištenjem, te da su ovi polimeri pogodni za poboljšanje mukoadhezivnih svojstava nanosuspencije buparvakvona. Romero i suradnici (8) su pripravili nanosuspenciju deksametazon acetata i polimiksina B za okularnu primjenu, dodatkom kationskih stabilizatora benzalkonijeva klorida i cetilpiridin klorida, koji se inače koriste kao konzervansi u okularnim pripravcima. Mukoadhezivna svojstva pripremljenih formulacija procijenili su mjerenjem zeta potencijala otopine mucina, nanosuspencije te smjese nanosuspencije i otopine mucina u različitim omjerima. Za razliku od otopine mucina, koja ima negativan zeta potencijal, kationska nanosuspencija ima pozitivan zeta potencijal.

Dodatkom otopine mucina nanosuspenziji, vrijednost zeta potencijala se smanjuje na vrijednost oko 0 mV, što ukazuje na to da je došlo od adsorpcije kationskih čestica na negativno nabijene molekule mucina.

S obzirom na sastav i morfologiju, submikronski sustavi se ugrubo dijele na nanokristale, koji sadrže najvećim dijelom samo djelatnu tvar, i nanočestice, koje mogu imati polimerni ili lipidni nosač (9). Nanokristali djelatne tvari su terapijski sustavi koji se sastoje od djelatne tvari veličine čestica ispod 1 μm i minimalne količine stabilizatora (surfaktanta i/li polimera), a nanosuspenzije su koloidne suspenzije nanokristala djelatne tvari u disperzijskom sredstvu (5; 10).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je dati pregled dostupne literature koja opisuje načine pripreme nanokristala djelatne tvari s posebnim naglaskom na odabir načina pripreme ovisno o svojstvima djelatne tvari. U radu će se opisati metode karakterizacije nanokristala djelatne tvari s kojima se osigurava kvaliteta farmaceutskog proizvoda s nanokristalima djelatne tvari, poboljšava bioraspoloživost i djelotvornost te sigurnost primjene. Prikazat će se analitičke tehnike koje se primjenjuju za ispitivanje veličine i morfologije nanokristala djelatne tvari, površinskog naboja čestica, kristalnog oblika te promjene amorfnog u kristalni oblik, sedimentacije, kemijske stabilnosti, topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Prednosti primjene nanokristala djelatnih tvari

Jedna od prednosti terapijskih sustava koji sadrže nanokristale djelatnih tvari pred ostalim terapijskim sustavima je u tome da se na ovaj način mogu formulirati djelatne tvari netopljive i u vodenim medijima i u organskim otapalima (tzv. *brickdust* tvari). Osim toga, s obzirom da takvi pripravci sadrže visok udio djelatne tvari, uz minimalne količine stabilizatora, poboljšava se učinkovitost i sigurnost jer se može primijeniti manji volumen kod parenteralne primjene. Nadalje, poboljšana bioraspoloživost znači da se za isti *in vivo* učinak može primijeniti manja doza. Ostale prednosti vezane za pojedine načine primjene objašnjene su u nastavku.

3.1.1. Oralna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala

Oralna primjena lijekova i dalje je najzastupljenija od svih načina primjene lijekova. Apsorpcija djelatne tvari u gastrointestinalnom sustavu sastoji se od dva koraka: (i) oslobađanje djelatne tvari iz ljekovitog pripravka i otapanje u gastrointestinalnim tekućinama i (ii) prijenos tvari preko epitelnih stanica. Na topljivost djelatne tvari može se utjecati smanjenjem veličine čestica jer se povećanjem omjera površine čestice i njenog volumena poboljšava brzina otapanja (kinetička topljivost) i povećava ukupna količina tvari koja se može otopiti u volumenu otapala (termodinamička topljivost). Poboljšanje apsorpcije i smanjenje varijabilnosti ljekovitih pripravaka koji sadrže djelatnu tvar u obliku nanokristala u odnosu na konvencionalne ljekovite pripravke istih djelatnih tvari posljedica je poboljšane topljivosti i brzine oslobađanja te svojstva mukoadhezivnosti, a očituje se u vidu povećanja vršne koncentracije lijeka u plazmi (C_{\max}), smanjenju vremena potrebnom da se postigne vršna koncentracija lijeka u plazmi (t_{\max}) i povećanju površine u prikazu ovisnosti

koncentracije lijeka u plazmi o vremenu (AUC). S obzirom na višu topljivost i poboljšanu bioraspoloživost u odnosu na neobrađenu djelatnu tvar, za postizanje istog *in vivo* odgovora može biti potrebno primijeniti manju dozu ljekovitog pripravka koji sadrži djelatnu tvar u obliku nanokristala. Liversidge i Cundy (11) su *in vivo* testiranjem na biglovima usporedili apsolutnu bioraspoloživost danazola iz komercijalnog proizvoda (Danocrine[®]) (veličina čestica danazola 10 μ m) i nanokristala danazola (veličina čestica danazola 169 nm). Apsolutna bioraspoloživost danazola iz konvencionalnog pripravka je vrlo niska i iznosi 5.1%, ali primjenom pripravka koji sadrži nanokristale danazola znatno se povećava i iznosi 82.3%.

Kod slabo topljivih tvari velik izazov predstavlja i utjecaj hrane, jer takve tvari obično pokazuju pH ovisnu topljivost. Mnoge slabo topljive tvari imaju puno višu bioraspoloživost primjenom nakon obroka jer se pri tim uvjetima lijek dulje zadržava u želucu (gastrična pH vrijednost niža od intestinalne, bez obzira na hranu), veći je volumen dostupne tekućine i luče se žučne soli, što sve pogoduje otapanju slabo topljivih tvari. Utjecaj se može vidjeti na primjeru slabo topljivih slabih baza, koje su najbolje topljive u kiselim uvjetima. Do otapanja će dolaziti odmah po raspadu formulacije, dok će do apsorpcije otopljene tvari doći najčešće u intestinalnom dijelu GI trakta. Ukoliko je razlika u topljivosti natašte u gastričkom i intestinalnom dijelu prevelika, može doći do efekta superzasićenja, te do taloženja prijelazom u intestinalni sustav (12). U uvjetima nakon uzimanja hrane, iako se radi o višoj gastričkoj pH vrijednosti, dolazi do boljeg otapanja zbog većeg dostupnog volumena, duljeg zadržavanja u želucu i solubilizacije otopljene tvari žučnim solima (stvaranje micela), jer se uglavnom radi o lipofilnim djelatnim tvarima. Na taj se način smanjuje efekt prezasićenosti i posljedično taloženje u intestinalnom traktu. Sve navedeno vodi do toga da većina slabo topljivih djelatnih tvari ima bolju bioraspoloživost ukoliko se lijek primjeni nakon obroka. Poboljšanjem topljivosti smanjuje se utjecaj hrane jer se topljivost u svim uvjetima poveća dovoljno da se

minimiziraju razlike u topljivosti tvari u uvjetima natašte i nakon uzimanja hrane. Jinno i suradnici (13) su ispitali utjecaj veličine čestica i hrane na apsorpciju cilostazola. Studija je provedena na biglovima, kojima su prije i nakon obroka primijenjene nanosuspenzija (220 nm), mikrosuspenzija (2.4 μ m) i suspenzija (13 μ m) cilostazola. Rezultati su pokazali da se smanjenjem veličine čestica poboljšava apsolutna bioraspoloživost (86% za nano-, 15% za mikro- i 14% za suspenziju natašte). Nadalje, farmakokinetički parametri C_{\max} i AUC nakon uzimanja hrane nisu se statistički značajno promijenili primjenom nanosuspenzije (ne vidi se utjecaj hrane na bioraspoloživost), dok primjenom mikrosuspenzije i suspenzije postoji značajna razlika u bioraspoloživosti prije i nakon obroka. Na biglovima su i Quinn i suradnici (14) proveli *in vivo* studiju ispitivanja bioraspoloživosti slabo topljive djelatne tvari ELND006. Nanosuspenzija (159 nm) je ispitana u odnosu na neobrađenu djelatnu tvar (50 μ m), a primjena oba pripravka provedena je prije i nakon uzimanja hrane. Ovisno o unosu hrane, bioraspoloživost se za neobrađenu djelatnu tvar poveća s 11% na 63%, a za nanosuspenziju s 87% na 110%, što znači da se smanjenjem veličine čestica eliminira utjecaj hrane na bioraspoloživost ispitane djelatne tvari. Deschampes i suradnici (15) su proveli studiju ispitivanja bioraspoloživosti megestrol acetata na ljudima, natašte i nakon obroka. Megestrol acetat se koristi za poticanje apetita u terapiji kaheksije, stanja krajnje iscrpljenosti organizma, kod pacijenata oboljelih od AIDSa. Usporedbom registrirane nanosuspenzije Megace[®] ES u odnosu na registriranu oralnu suspenziju Megace[®] potvrđene su pretpostavke o smanjenju utjecaja hrane primjenom lijeka koji sadrži nanokristale megestrol acetata. Bioraspoloživost megestrol acetata iz oralne suspenzije jako ovisi o unosu hrane (omjer AUC natašte i nakon obroka je 0.456), a iz nanosuspenzije znatno manje (omjer AUC natašte i nakon obroka je 0.743). Iako je utjecaj hrane i dalje prisutan, znatno je smanjen u odnosu na konvencionalnu suspenziju. S obzirom da pripadnici populacije oboljeli od AIDSa u stanju kaheksije konzumiraju obroke male kalorijske vrijednosti puno učestalije nego obroke velike

kalorijske vrijednosti, kakvi su primijenjeni u provedenoj *in vivo* studiji, velika ovisnost bioraspoloživosti o unosu hrane govori da se primjenom lijeka nakon laganog obroka ili natašte ne postiže terapijska koncentracija lijeka. Stoga je nanosuspenzija sa smanjenim utjecajem hrane na bioraspoloživost potencijalno bolja terapija za navedenu populaciju.

Nadalje, smanjenje veličine čestica djelatnih tvari vodi do brže apsorpcije, odnosno kraćeg t_{\max} u odnosu na konvencionalne pripravke, što su pokazano brojnim studijama (13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20). Skraćenje vremena potrebnog da se postigne vršna koncentracija lijeka u plazmi pogotovo je bitna kod primjene nestereoidnih protuupalnih lijekova, koji mogu izazvati oštećenje sluznice želuca i tankog crijeva.

3.1.2. Parenteralna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala

Parenteralna primjena lijekova je primjena kojom se zaobilazi probavni trakt, a odnosi se na unos u organizam injektiranjem u venu (intravenski), u mišić (intramuskularno) te pod kožu (subkutano). Prednosti ovih načina primjene pred oralnim načinom uključuje zaobilaženje metabolizma lijeka pri apsorpciji i prvom prolasku kroz jetru, sprječavanje mikrobiološke i/ili kemijske razgradnje lijeka i izbjegavanje učinka hrane.

Intravenska primjena ljekovitih pripravaka koji sadrže slabo topljive djelatne tvari može imati nedostatke u vidu sigurnosti i toksičnosti, jer se često za poboljšanje topljivosti koriste organska ko-otapala, solubilizatori ili ekstremne pH vrijednosti. To može uzrokovati različite nuspojave poput toksičnosti ili taloženja nakon primjene. Primjerice, korištenje solubilizatora Cremophor-EL u Taxol[®]-u (registrirani proizvod koji sadrži paklitaksel) povezano je s hipersenzitivnošću, nefrotoksičnošću i neurotoksičnošću (21). Vodene nanosuspenzije za intravensku primjenu se razvijaju zbog dva razloga – da se smanje nuspojave postojećih intravenskih proizvoda i da se ispita mogućnost ciljane dostave lijeka. Za intravensku primjenu veličina čestica je vrlo bitan parametar jer je najmanji promjer kapilara 5 μm .

Veličina čestica ljekovitog pripravka mora biti u skladu s time jer u suprotnom može doći do začepjenja kapilara i embolije. Nadalje, ako je veličina čestica dovoljno malena (< 200 nm) da se nanokristali djelatne tvari otapaju trenutno intravenskom primjenom, farmakokinetički profil nanosuspenzije će biti sličan profilu otopine, tj. nanosuspenzija će imati trenutno djelovanje. Ako je veličina čestica veća ili se djelatna tvar slabo otapa u krvi, oslobađanje će biti sporije, a čestice u sistemskej cirkulaciji će biti prepoznate kao strane čestice i apsorbirane od strane makrofaga, u kojima se čestice dalje otapaju. Otopljene čestice mogu djelovati unutar inficiranih makrofaga ili prijeći staničnu membranu tako da makrofazi djeluju kao svojevrsno skladište nanokristalnih čestica i omogućuju produljeno djelovanje lijeka. Ovaj način pasivne apsorpcije nanokristalnih čestica pogodan je za terapiju infekcije makrofaga, autoimunih poremećaja, dijabetesa, reumatoidnog artritisa itd. Razvoj ljekovitih pripravaka koji sadrže nanokristale djelatne tvari se dalje razvija u smjeru ciljane dostave lijekova u određene organe, npr. mozak. Iako čestice veličine > 50 nm ne mogu prijeći barijeru između krvi i mozga, to se omogućava modifikacijom površine sufraktantima (6).

Parenteralnom primjenom nanosuspenzija može se smanjiti volumen primjene u odnosu na konvencionalne otopine ili suspenzije, jer nanosuspenzije sadrže visok udio djelatne tvari, uz minimalne količine stabilizatora. Manji volumen primjene, zajedno s poboljšanjem topljivosti uz izbjegavanje organskih otapala ili ekstremnih pH vrijednosti, utječu na bolju učinkovitost i sigurnost primjene.

3.1.3. Oftalmička primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala

Lokalna primjena konvencionalnih oftalmičkih pripravaka (kao što su kapi za oko u obliku otopine ili mikrosuspenzije) često je praćena iritacijom, zamagljenim vidom i koncentracijom lijeka nižom od terapijski značajne koncentracije zbog gubitka djelatne tvari kroz nazolakrimalni kanal i treptanja. To nadalje vodi do loše bioraspoloživosti djelatne tvari,

potrebna je česta primjena kako bi se zadržala terapijska koncentracija lijeka, što može uzrokovati neželjenu sistemska apsorpciju. Primjenom djelatne tvari u obliku nanokristala smanjuje se iritacija i suzenje oka, a manji je gubitak djelatne tvari kroz otjecanje suza kroz nazolakrimalni kanal. Poboljšana topljivost će utjecati na povećan prijelaz otopljene tvari u tkivo oka, a bioadhezivna svojstva nanokristala na dulje održavanje kontakta nanokristala djelatne tvari s tkivom. Nadalje, bioadhezivna svojstva formulacije se mogu poboljšati ugradnjom u mukoadhezivne polimere poput kitozana (22) ili adsorpcijom mukoadhezivnih kationskih surfaktanata poput benzalkonijeva klorida i cetilpiridin klorida (8).

3.1.4. Pulmonalna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala

Pulmonalna dostava lijeka postiže se stvaranjem aerosola inhalatorima ili nebulizatorima, a djelovanje može biti lokalno i sistemska. Primjena aerosola koji sadrže nanokristale djelatne tvari ima prednosti pred konvencionalnim aerosolima u vidu bolje raspodjele čestica djelatne tvari u raspršenim kapljicama, što omogućava preciznije doziranje (23).

3.2. Nedostaci primjene nanokristala djelatnih tvari

Iako imaju dosta prednosti, kao i ostali terapijski sustavi, nanokristali djelatne tvari imaju i svoje nedostatke. Jedan od njih je složena priprava i odabir odgovarajućih stabilizatora u točno određenoj koncentraciji kako bi se onemogućili fizikalni procesi poput rasta kristala, agregacije te promjene kristalnog oblika tijekom priprave ili skladištenja. Drugi nedostatak je potencijalna nanotoksičnost, odnosno štetni utjecaj na ljude, pogotovo u slučaju dugotrajne terapije. Naime, ako se nanočestice promatra kroz njihovu veličinu u odnosu na veličinu ljudskih stanica (od kojih neke mogu biti veličine 6 – 10 μm), vidljivo je da ih ljudske stanice mogu apsorbirati. Nanočestice veličine 100 – 1000 nm mogu biti apsorbirane samo putem

makrofaga procesom fagocitoze, dok čestice veličine do 100 nm mogu apsorbirati sve ljudske stanice procesom endocitoze. Nadalje se postavlja i pitanje biorazgradivosti i eliminacije, što se više odnosi na nanočestice nego nanokristale. S obzirom na veličinu čestica i biorazgradivost, Müller i suradnici (24) su predložili nanotoksikološki sustav klasifikacije (NCS, eng. *Nanotoxicological Classification System*), prema kojem se nanosustavi dijele u 4 kategorije:

- Kategorija 1 – veličina iznad 100 nm, biorazgradivi
- Kategorija 2 – veličina iznad 100 nm, ne-biorazgradivi
- Kategorija 3 – veličina do 100 nm, biorazgradivi
- Kategorija 4 – veličina do 100 nm, ne-biorazgradivi

Te granice propisuje i Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, eng. *Food and Drug Administration*). Za lijekovite pripravke koji sadrže djelatnu tvar < 100 nm u barem jednoj dimenziji, FDA je izdao smjernice prema kojima takvi pripravci podliježu različitim regulatornim zahtjevima i prema kojima je puno pozornosti posvećeno dokazivanju neškodljivosti i ispitivanju nanotoksičnosti tj. potencijalnog štetnog utjecaja na ljude i dugotrajnog izlaganja nanomaterijalima (25; 26).

3.3. Priprava nanokristala djelatne tvari

Dva osnovna pristupa pripravi nanokristala su povećanje veličine čestica djelatne tvari taloženjem i smanjenje veličine čestica. Kod taloženja se iz otopine djelatne tvari molekule kontrolirano agregiraju u veće čestice. Metodama smanjenja veličine čestica se djelatne tvari većih čestica usitnjavanju na željenu veličinu. U literaturi se ta dva načina često nazivaju *bottom up* i *top down* tehnologijama priprave (10; 24; 27; 28). Koja tehnologija će se

primijeniti u pripravi nanokristala djelatne tvari najviše ovisi o njezinim svojstvima, primjerice o topljivosti supstancije u organskim otapalima, kemijskoj i fizikalnoj stabilnosti (polimorfija, sklonost razgradnji, lipofilnost).

Neke od patentiranih tehnologija prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Patentirane tehnologije pripreme nanokristala djelatne tvari (27; 29)

| Tehnologija | Tvrtka | Pristup | |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Hydrosol [®] | Novartis | povećanje čestica | taloženje |
| Nanomorph [®] | BASF/Soliqs | djelatne tvari | taloženje |
| Dissocubes [®] | SkyePharma | smanjivanje čestica djelatne tvari | HPH* |
| Nanopure [®] | PharmaSol | | HPH* |
| NanoCrystal [®] | Elan Drug Delivery Systems | | vlažno mljevenje |
| IDD [®] | SkyePharma | | HPH* |
| Nanoedge [®] | Baxter | kombinacija | taloženje + HPH* |
| smartCrystal [®] | PharmaSol | kombinacija | |

*HPH - Visokotlačna homogenizacija (eng. *High pressure homogenization*)

3.3.1. Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari

Dovođenjem otopine djelatne tvari u stanje prezasićenja spontano dolazi do taloženja. Proces taloženja se odvija u dva koraka – stvaranjem kristalnih jezgri ili nukleacijom i rastom kristala. Za nastanak stabilne suspenzije, prvi korak treba biti brz, kako bi nastao velik broj kristalnih jezgri, a drugi spor (9). Stanje prezasićenja koje je potrebno za brzu nukleaciju se postiže brzim umješavanjem otopine u antiotapalo. Nastankom kristalnih jezgri smanjuje se stupanj prezasićenja pa je rast kristala sporiji. Brzom kristalizacijom obično nastaju amorfni ili nestabilni oblici, što s vremenom može dovesti do promjene u najstabilniji oblik. Prva patentirana tehnologija kontroliranog taloženja je Hydrosol[®] (Novartis) (30). Kasnije je

Nanomorph[®] tehnologija patentirana za pripravu amorfnih nanosuspenzija (BASF/Soliqs). Taloženje djelatne tvari može se postići (i) izravnim miješanjem otopine s antiotapalom, (ii) koristeći superkritični fluid ili (iii) otparavanjem otapala (27).

3.3.1.1. Taloženje izazvano miješanjem otapala i antiotapala

Najjednostavniji i najekonomičniji proces taloženja djelatne tvari iz otopine temelji se na dodatku antiotapala otopini. Pri tome djelatna tvar treba biti topljiva u otapalu, a otapalo i antiotapalo međusobno se moraju miješati. Kako su molekule djelatnih tvari uglavnom topljive u organskim otapalima, a manje topljive ili netopljive u vodenim medijima, kao otapala u ovim postupcima koriste se najčešće organska otapala poput etanola (31), metanola (32; 33), dimetil sulfoksida (34), acetona (35) ili izopropanola (36) ili smjesa otapala koja sadrže polietilen glikole (PEGovi) ili propilen glikol, iako je zabilježena i primjena vodenih otapala (37). Kao antiotapala se najčešće koriste vodene otopine stabilizatora. Ovisno o odabranom otapalu i antiotapalu, omjeru njihovih volumena, redoslijedu i brzini miješanja, koncentraciji otopljene tvari u otapalu te odabiru stabilizatora i načinu poticanja kristalizacije utječe se na stupanj kristalizacije i veličinu čestica koje nastaju ovim procesom. Kako bi stupanj prezasićenja bio što viši, a s tim i veličina čestica što niža i ujednačenija, odabrano otapalo bi trebalo biti ono u kojem je djelatna tvar najtopljivija, a omjer volumena otapala i antiotapala što viši (npr. 1:15) (33; 34).

Međutim, za svaki sustav potrebno je pronaći optimalne vrijednosti parametara poput koncentracije djelatne tvari u otapalu ili omjera volumena otapala i antiotapala pri kojima je priprava nanosuspenzija najučinkovitija u pogledu veličine čestica i indeksa polidisperzije, jer iznad tih vrijednosti dolazi do aglomeracije zbog velikog broja nastalih kristalnih jezgri (35). Kristalizacija čestica djelatne tvari može biti spontana (izazvana brzim umješavanjem otopine u antiotapalo) (38) ili inducirana ultrazvučnim valovima (sonoprecipitacija) (18; 39) ili nekim promjenama u vanjskom okruženju, kao što je npr. primjena polja visoke gravitacije (36).

Primjenom ultrazvuka tijekom pripreve nanokristala postiže se ujednačenija raspodjela veličine čestica (33; 40). Ukoliko se otopina djelatne tvari u organskom otapalu raspršuje u vodeni medij u obliku finih kapljica, uz primjenu vakuuma kojim se uklanja organsko otapalo, djelatna tvar ostaje u vodenom mediju raspršena u obliku sitnih čestica (16; 41).

3.3.1.2. Taloženje u prisutnosti superkritičnog fluida

Taloženje djelatne tvari može se provesti i korištenjem superkritičnog fluida (npr. ugljikov dioksid, amonijak, etan, etilen), bilo kao otapala (RESS, *Rapid expansion of supercritical solution*) ili kao antiotapala (SAS, *Supercritical antisolvent*) (20; 27; 42; 43). Zbog prihvatljivih vrijednosti kritične temperature i tlaka, te lake dostupnosti, netoksičnosti i nezapaljivosti, u farmaceutskoj industriji najčešće je korišten CO₂. Međutim, zbog loše topljivosti polarnih molekula u CO₂, za poboljšanje topljivosti može se koristiti kootapalo (RESS-SC, *Rapid Expansion from Supercritical with solid cosolvent*) (44). Postupak se dodatno može modificirati ekspanzijom otopine u neki tekući medij umjesto u zrak – RESOLV (*Rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent*) i RESAS (*Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution*) (45).

3.3.1.3. Taloženje izazvano uklanjanjem otapala

Konvencionalnim tehnologijama uklanjanja otapala poput sušenja raspršivanjem (eng. *spray drying*) ili sušenja smrzavanjem (eng. *freeze drying*) ne mogu se postići veličine čestica djelatne tvari u submikronskom području. Međutim, istraživanja su pokazala kako se sušenje raspršivanjem može modificirati koristeći uređaj NanoSprayDryer B-90, na način da se otopina djelatne tvari raspršuje u uređaj kroz piezoelektričnu vibrirajuću mrežicu, a nastale električki nabijene nanočestice se skupljaju na elektrodama. Na veličinu čestica pripremljenih nanokristala utječe veličina otvora piezoelektrične vibrirajuće mrežice i koncentracija djelatne tvari u otopini (46; 47). Na karakteristike nanokristala djelatne tvari pripremljenih

kontroliranom kristalizacijom tijekom sušenja smrzavanjem, raspršivanjem u tekući dušik, utječu koncentracija otopljene djelatne tvari, omjer volumena otapala i vode te brzina smrzavanja (raspršivanja) (48).

3.3.2. Metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari

Za razliku od metoda povećanja čestica djelatne tvari, koje se temelje na stvaranju kristala iz otopine djelatne tvari, metode smanjenja čestica djelatne tvari za polazište imaju već postojeće kristale. Smanjenje veličine čestica može se postići vlažnim mljevenjem ili visokotlačnom homogenizacijom neobrađene ili mikronizirane djelatne tvari (29).

3.3.2.1. Vlažno mljevenje

Tehnologija vlažnog mljevenja je poznata pod nazivom Nanocrystals[®] (Elan Drug Delivery Systems) (30). Postupak se temelji na podvrgavanju suspenzije djelatne tvari u otopini stabilizatora i/ili surfaktanta mljevenju kuglicama. Mljevenje se provodi u odgovarajućoj komori, a odabir materijala od kojih su izrađene kuglice ovisi o tvrdoći djelatne tvari, pa tako kuglice mogu biti staklene, od cirkonijevog oksida, nehrđajućeg čelika ili nekog polimernog materijala. Do smanjenja veličine čestica dolazi uslijed sudara čestica djelatne tvari sa kuglicama za mljevenje, stjenkama komore za mljevenje i drugim česticama djelatne tvari, kao i zbog velike sile smicanja uslijed velike brzine miješanja.

Na karakteristike krajnjeg proizvoda utječu:

- svojstva djelatne tvari i polazne suspenzije – odabir disperzijskog sredstva i stabilizatora, viskoznost suspenzije, vrsta i koncentracija stabilizatora, koncentracija djelatne tvari
- parametri postupka – dimenzije i broj kuglica, brzina i trajanje mljevenja.

Brojna su istraživanja provedena na području pripreme nanokristalnih suspenzija tehnologijom vlažnog mljevenja. U svima je uglavnom ispitivan utjecaj odabira vrste i koncentracije stabilizatora, volumena kuglica te trajanja i brzine mljevenja na fizikalnu stabilnost i veličinu čestica nanokristala djelatne tvari. Iako se svi ti parametri razlikuju ovisno o djelatnoj tvari, općenito se može zaključiti da se dužim i/ili bržim mljevenjem postižu manje čestice (19; 49; 50; 51). Povećanjem volumena kuglica smanjuje se veličina čestica nanokristala djelatne tvari kao i indeks polidisperzije, zbog povećanog broja sudara čestica i kuglica (50). Međutim, navedeni parametri imaju neku optimalnu vrijednost, iznad koje dolazi do aglomeracije uzrokovane sudarima čestica i smanjenja odbojnih sila između čestica zbog destabilizacije sustava dodatnom mehaničkom energijom (49; 50).

3.3.2.2. Visokotlačna homogenizacija

Visokotlačna homogenizacija (HPH, *High pressure homogenization*) je postupak smanjenja veličine čestica djelatne tvari višestrukim propuštanjem suspenzije velikom brzinom kroz otvor vrlo malih dimenzija. Tri su patentirane tehnologije visokotlačne homogenizacije - Microfluidization[®] (SkyePharma), Dissocubes[®] (SkyePharma) i Nanopure[®] (PharmaSol) (30). Dissocubes[®] i Nanopure[®] tehnologije su tzv. homogenizatori s pomičnim klipom (eng. *piston-gap*), u kojima se mikrosuspenzija djelatne tvari propušta kroz otvor veličine 5–20 µm. Do smanjenja veličine čestica Dissocubes[®] tehnologijom dolazi zbog kavitacije, međusobnih sudara čestica i velikih sila smicanja. Za razliku od Dissocubes[®] tehnologije, kojom se provodi homogenizacija isključivo vodenih suspenzija, Nanopure[®] tehnologijom se mogu homogenizirati suspenzije u nevodenim medijima ili medijima s malim udjelima vode, a proces se odvija pri vrlo niskim temperaturama. Microfluidization[®] tehnologija je tzv. mlazni (eng. *jet-stream*) homogenizator, a do smanjenja veličine čestica također dolazi, kao i kod Dissocubes[®] tehnologije, zbog kavitacije, turbulencije, međusobnih sudara čestica i velikih

sila smicanja. Osnovna razlika u dizajnu je to što se suspenzija dijeli u dva mlaza koja se, po prolasku kroz otvore malih dimenzija, međusobno sudaraju.

Veličina čestica nanokristala djelatne tvari pripravljene visokotlačnom homogenizacijom ovisi o primijenjenom tlaku, broju ciklusa propuštanja, temperaturi pri kojoj se postupak odvija, vrsti i udjelu stabilizatora i koncentraciji suspenzije (52; 53).

3.3.3. Kombinirane metode

Kombinacijom različitih metoda mogu se prevladati nedostaci pojedinačnih, odnosno prednosti dostupnih mogu se iskoristiti na način da se metode nadopunjavaju. Obično se radi o niskoenergetskom postupku koji prethodi (mljevenje ili taloženje), nakon kojeg slijedi visokoenergetski postupak (visokotlačna homogenizacija). Primjerice, taloženje je brz postupak, ali je pripravljena suspenzija nanokristala djelatne tvari nestabilna i podložna rastu kristala. S druge strane, da bi se nanosuspenzija pripravlila HPH tehnologijom, potrebno je prvo pripremiti mikrosuspenziju, kako ne bi došlo do začepjenja mlaznice homogenizatora. Nanoedge[®] tehnologija objedinjuje ta dva postupka - nestabilna suspenzija se priprema taloženjem, a zatim se podvrgava visokotlačnoj homogenizaciji. Opisanim postupkom postiže se bolja stabilnost nanosuspenzija u odnosu na taloženje, a skraćeno trajanje procesa u odnosu na HPH (24). Nadalje, pod nazivom smartCrystal[®] tehnologije krije se cijeli niz postupaka, od kojih svaki obuhvaća niskoenergetski postupak koji prethodi i HPH. Niskoenergetski postupak može biti sušenje raspršivanjem, taloženje, vlažno mljevenje ili liofilizacija (24).

Bez obzira na prethodni postupak u kombiniranim tehnologijama, visokotlačna homogenizacija je postupak kojim se osigurava fizikalna stabilnost pripremljenih suspenzija nanokristala djelatne tvari, jer se njome može postići uža raspodjela veličine čestica, uz zadržavanje početnog kristalnog oblika (uska raspodjela veličine čestica ukazuje na to da ne bi trebalo dolaziti od rasta kristala, a nepromijenjeni kristalni oblik da ne bi trebalo dolaziti do

kristalnih transformacija) (54). Međutim, zabilježeno je i da ukoliko tijekom niskoenergetkog postupka dolazi do amorfizacije, homogenizacijom može doći do porasta kristaliničnosti (55; 56), što u konačnici rezultira smanjenom topljivošću formulacija kod kojih je primijenjena homogenizacija u odnosu na one kod kojih nije.

4. RASPRAVA

4.1. Prednosti i nedostaci tehnologija pripreme nanokristala djelatne tvari

Postupci taloženja su uglavnom niskoenergetski i odvijaju se pri nižim temperaturama, pa su pogodni za termolabilne tvari. Zbog brze kristalizacije struktura kristala je krhka i nepravilna (nastali kristali sadrže inkluzije i dislokacije) pa se lako mogu dalje obrađivati primjenom metoda smanjenja veličine čestica djelatne tvari (9). Međutim, da bi se nanokristali djelatne tvari pripravili taloženjem, djelatna tvar mora biti topljiva u barem jednom otapalu, što znači da ova metoda nije primjenjiva za molekule netopljive u vodenim medijima i u organskim otapalima. Odabir otapala i antiotapala je kritičan jer se moraju međusobno moći miješati. S obzirom na korištenje organskih otapala, njihovo uklanjanje može predstavljati problem, a tijekom skladištenja je potrebno kontrolirati ostatna otapala prema važećoj regulativi, između ostalog i zato jer ostatna otapala mogu izazvati otapanje manjih čestica i rast kristala. Prilagođavanje laboratorijskih uvjeta na industrijske količine nije jednostavan jer parametri postupka jako ovise o količini suspenzije koja se obrađuje. Nadalje, kako se postupcima taloženja postižu uglavnom amorfne čestice, tijekom skladištenja je potrebno kontrolirati polimorfizam i udio amorfne tvari, jer je povećanje topljivosti i poboljšanje *in vivo* učinka djelomično posljedica prijelaza kristalnog oblika tvari u amorfni, a ne samo smanjenja veličine čestica. Osim toga, fizikalna stabilnost može biti ugrožena i rastom kristala, koji je značajniji kod nanosuspenzija koje su pripremljene taloženjem zbog šire raspodjele veličine čestica.

Postupkom vlažnog mljevenja i visokotlačne homogenizacije moguće je pripremiti nanokristale djelatnih tvari koje su netopljive i u vodenim medijima i u organskim otapalima. Za razliku od taloženja, ovi postupci ne zahtijevaju korištenje organskih otapala, a tijekom pripreme obično ne dolazi do promjene kristalnog oblika. Raspodjela veličine čestica

nanosuspenzija pripremljenih ovim postupcima je uniformna, a procesi su ponovljivi i lako se prenose s laboratorijske količine na proizvodnu. Osnovni nedostatak vlažnog mljevenja je mogućnost erozije kuglica pa u konačnom proizvodu postoje onečišćenja. Nadalje, vlažnim mljevenjem može doći do gubitka djelatne tvari na kuglicama i stjenkama komore za mljevenje. S obzirom da se postupkom mljevenja razvija toplina zbog trenja, tehnologija nije primjenjiva na termolabilne tvari jer može doći do kemijske razgradnje ili promjene kristalnog oblika. Visokotlačna homogenizacija je visokoenergetski postupak za kojeg suspenzija treba prethodno biti obrađena kako ne bi došlo do začepjenja dovoda suspenzije. Za postizanje malih veličina čestica mljevenjem i homogenizacijom ponekad može biti potrebno dosta dugo vrijeme.

U Tablici 2 dan je pregled primijenjenih načina priprave nanokristala različitih djelatnih tvari i postignutog *in vivo* učinka.

Tablica 2. Primjeri načina pripreme nanokristala različitih djelatnih tvari i postignutog *in vivo* učinka

| Djelatna tvar | Način pripreme / veličina čestica | Kontrolna tehnologija | F _{rel} * | referenca |
|----------------------------|---|--------------------------|--------------------|-----------|
| Atorvastatin | Taloženje / 260 nm | Suspenzija atorvastatina | 172% | (32) |
| | | Komercijalne tablete | 178% | |
| Simvastatin | Taloženje uz UZV / 360 nm | Suspenzija simvastatina | 144% | (18) |
| Cefuroksim aksetil (CA) | Taloženje uz UZV / 130 nm | Amorfne mikročestice CA | 154% | (40) |
| | | Neobrađeni CA | 192% | |
| | | Taloženje CA bez UZV | 137% | |
| Ezetimib | Taloženje / >600 nm | Suspenzija ezetimiba | 300% | (57) |
| Rezveratrol | Taloženje / 140 nm | Suspenzija rezveratrola | 127% | (17) |
| Kurkumin | Taloženje uz superkritični fluid / 635 – 750 nm | Neobrađeni kurkumin | 304 – 1169% | (43) |
| Telmisartan | Taloženje uparavanjem / 83 nm | Suspenzija telmisartana | 1060% | (16) |
| Apigenin | Taloženje uz superkritični fluid / 563 nm | Suspenzija apigenina | 339% | (20) |
| Febuksostat | Vlažno mljevenje / 251 nm | Neobrađeni febuksostat | 222% | (50) |
| Spoj A | Vlažno mljevenje / 224 nm | Suspenzija spoja A | 820% | (58) |

*F_{rel} – relativna bioraspoloživost

Tablica 2 (nastavak). Primjeri načina pripreme nanokristala različitih djelatnih tvari i postignutog *in vivo* učinka

| Djelatna tvar | Način pripreme / veličina čestica | Kontrolna tehnologija | F _{rel} * | referenca |
|----------------------|--|--|--------------------|-----------|
| Spoj A | Vlažno mljevenje / podatak nije dostupan | Suspenzija spoja A | 380% | (59) |
| Rebamipid | Vlažno mljevenje / 286 nm | Suspenzija referentne tablete (Mucosta®) | 157% | (51) |
| Paklitaksel | HPH / 186.8 nm | Suspenzija paklitaksela | 1438% | (60) |
| | | Taxol® | 351% | |
| Alisartan izoproksil | Vlažno mljevenje / 304 nm | Neobrađeni alisartan izoproksil | 473% | (17) |
| Taksifolin | Taloženje / 148 nm – 167.2 nm | Suspenzija taksifolina | 700% | (35) |
| Miricetin | Taloženje + HPH / 300 – 500 nm | Suspenzija miricetina | 161 – 357% | (61) |
| Meloksikam | Vlažno mljevenje / 119 nm | Suspenzija meloksikama | 507% | (19) |
| Itrakonazol | Vlažno mljevenje / 315 nm | Registrirani proizvod Sporanox® | 37.9% | (62) |
| Fenofibrat | Vlažno mljevenje / 642 nm | Registrirani proizvod Lipidil®ez | 89.6% | (63) |
| Paklitaksel | Taloženje uz UZV + HPH / 209 nm | Nanosuspenzija bez klaritromicina, koji blokira Pgp i CYP3A4 | 453% | (64) |

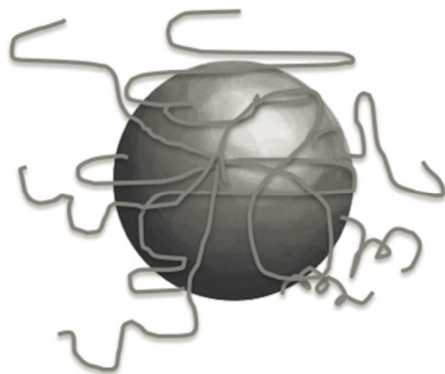
*F_{rel} – relativna bioraspoloživost

4.2. Stabilizacija suspenzija nanokristala djelatnih tvari

Stabilnost je vrlo bitno svojstvo suspenzija nanokristala djelatnih tvari u disperzijskom sredstvu. Bez obzira na način pripreme, one sadrže velik broj vrlo malih čestica velike ukupne površine, što uzrokuje veliku međupovršinsku napetost nanočestica i disperzijskog sredstva. Zbog toga su nanosuspenzije termodinamički nestabilni sustavi. Smanjenje slobodne energije i međupovršinske napetosti sustavi nastoje postići smanjenjem površine čestica otapanjem kristalnih jezgri ili njihovom aglomeracijom/agregacijom i rastom kristala. Te je procese potrebno spriječiti jer je velika ukupna površina čestica zapravo osnovna prednost nanosuspenzija pred mikrosuspenzijama kojom se postiže poboljšano *in vivo* djelovanje ljekovitih pripravaka koji se primjenjuju oralno. Osim toga, veličina čestica u submikronskom području izuzetno je važna za sigurnu intravensku primjenu ljekovitih pripravaka. Promjena svojstava nanosuspenzija se onemogućava ili barem usporava dodatkom površinski aktivnih tvari u postupku pripreme. One bi trebale istovremeno smanjivati međupovršinsku napetost i poboljšavati močljivost čestica (tj. smanjivati njihovu hidrofobnost) i sustavu ujedno pružati steričku ili elektrostatsku stabilizaciju (30). Kao sterički stabilizatori koriste se polimeri i neionski surfaktanti, dok se kao elektrostatski stabilizatori koriste ionski surfaktanti. Količina stabilizatora bi trebala biti najmanja moguća, da se zadrži visok udio nanokristala djelatne tvari, ali istovremeno dovoljno velika da se svojstva pripremljene suspenzije nanokristala djelatne tvari ne mijenjaju postupcima prevođenja u čvrsto stanje ili skladištenjem.

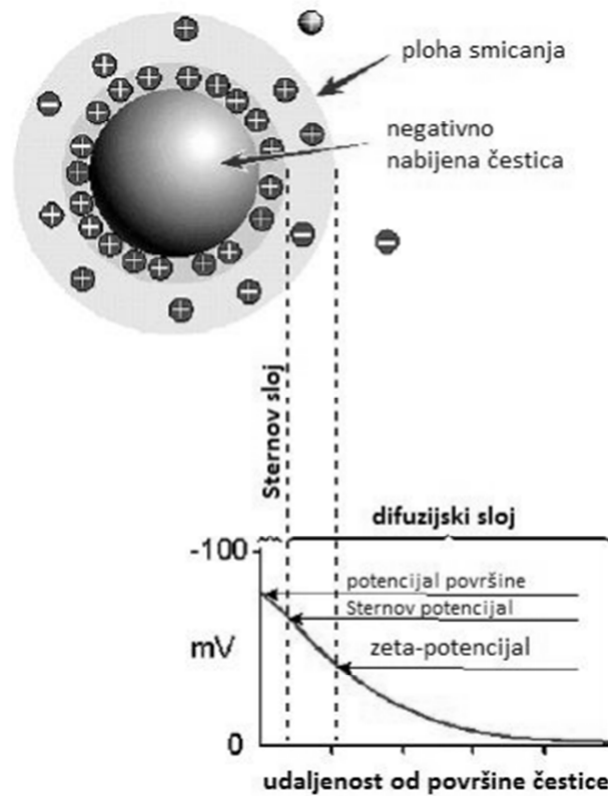
Sterička stabilizacija nanosuspenzija postiže se adsorpcijom polimera ili neionskih surfaktanata na površinu nanokristalnih čestica hidrofobnim dijelovima, dok se hidrofilni dijelovi molekula pružaju u disperzijsko sredstvo. Na taj se način smanjuje međupovršinska napetost i stvara se barijera između susjednih čestica (Slika 1). Molni udio hidrofobnih skupina u molekuli bi trebao biti iznad 15% kako bi se osigurala dobra pokrivenost površine

čestice hidrofobnim dijelovima molekula stabilizatora (65). Udio hidrofobnih dijelova za neionske surfaktante se izražava HLB vrijednošću (eng. *hydrophilic-lipophilic balance*), pri čemu povišenjem HLB vrijednosti raste hidrofilnost molekule.



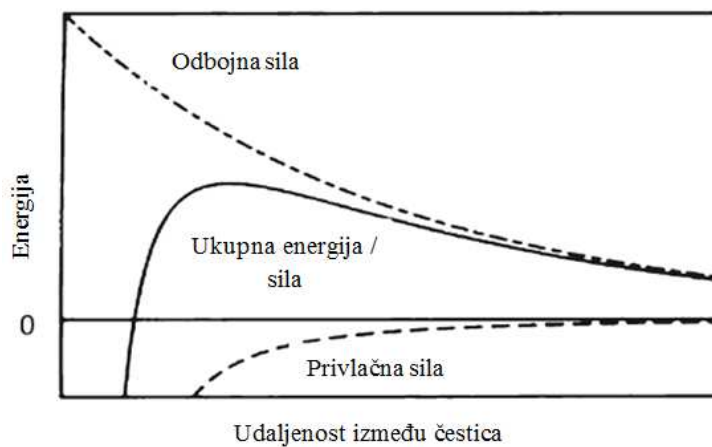
Slika 1 Shematski prikaz steričke stabilizacije – adsorbirani polimer na površinu nanokristalne čestice (preuzeto iz (30))

Elektrostatska stabilizacija objašnjava se Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekovom (DLVO) teorijom stabilnosti koloidnih sustava (66). Ta teorija govori da između čestica koloidnog sustava djeluju privlačne van der Waalsove sile i odbojne elektrostatske sile, koje su posljedica stvaranja električnog dvosloja. Električni dvosloj je pojava u kojoj se uz električki nabijenu česticu stvara ravnomjeran sloj nepomičnih suprotno nabijenih iona koji čvrsto priliježu na površinu (Sternov sloj) i difuzijski sloj u kojem se ioni mogu slobodno kretati (Gouy-Chapmanov sloj). U električnom polju će se nabijene čestice gibati prema elektrodi suprotnog predznaka, a zajedno s njima i Sternov sloj i dio difuzijskog sloja. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja naziva se elektrokinetički zeta potencijal (Slika 2).



Slika 2 Shematski prikaz električnog dvosloja (preuzeto iz (66))

Privlačne i odbojne sile zajedno određuju ukupnu potencijalnu energiju sustava (Slika 3). Iz prikaza ukupne energije je vidljivo da se smanjenjem udaljenosti dviju čestica povećava privlačna sila između čestica, pod uvjetom da čestice mogu prijeći energijski maksimum.



Slika 3 Dijagram potencijalne energije nanočestica (preuzeto iz (30))

4.2.1. Odabir stabilizatora

Za stabilizaciju nanosuspenzija najčešće se koristi kombinacija polimera i surfaktanta, kako bi se osigurala i sterička i elektrostatska stabilizacija. Odabir vrste stabilizatora, kao i njihovih koncentracija u nanosuspenziji, ovisi o svojstvima djelatne tvari i načinu pripreme nanosuspenzija, a zasad se najčešće provodi empirijski, ispitivanjem veličine čestica i fizikalne stabilnosti, i prema potrebi, *in vivo* učinka. Nakach i suradnici (67) su predložili sustavnu selekciju stabilizatora u dva koraka: (i) kvalitativna procjena velikog broja stabilizatora u svrhu ispitivanja utjecaja na veličinu čestica, zeta potencijal, fizikalnu stabilnost i viskoznost i (ii) kvantitativna procjena najboljeg kandidata iz prethodnog koraka.

Za razliku od steričkih stabilizatora, elektrostatski stabilizatori su učinkoviti samo u vodenim medijima, a učinkovitost im se dodatno gubi sušenjem jer se u suhom stanju ne može sačuvati ionizirano stanje. Nadalje, elektrostatski stabilizatori su osjetljivi na ionsku jakost disperzijskog sredstva jer se debljina električnog dvosloja smanjuje s povećanjem ionske jakosti medija pa je odbojna sila između jednako nabijenih čestica manja. Sterički stabilizatori moraju biti odabrani tako da imaju dovoljno jak afinitet prema česticama, kako bi izdržali sudare čestica izazvane Brownovim gibanjem. Osim toga, stabilizator ne bi trebao utjecati na topljivost djelatne tvari, jer to može potaknuti rast kristala. Od neionskih surfaktanata, najčešće se koriste poloksameri i Tween 80, a od ionskih NaLS. Najzastupljeniji polimeri su celulozni polimeri (HPMC – hidroksipropilmetil celuloza, HPC – hidroksipropil celuloza) i povidoni.

Iako odabir stabilizatora između ostalog ovisi o svojstvima djelatne tvari, provedena su istraživanja u svrhu ispitivanja korelacije svojstava djelatne tvari sa svojstvima stabilizatora, koji bi u određenoj koncentraciji učinkovito stabilizirao nanosuspenziju. Do sada još uvijek nema jednoznačnog odgovora koji bi bio jednako učinkovit za sve djelatne tvari. Međutim, moguće je povući određene korelacije koje donekle pojednostavljaju odabir stabilizatora.

George i Ghosh (68) su utvrdili da se metodom vlažnog mljevenja mogu pripremiti stabilne suspenzije hidrofobnih djelatnih tvari (visok logP) koje imaju visoku entalpiju, u kombinaciji sa stabilizatorom približno jednake hidrofobnosti. Djelatne tvari niže entalpije formiraju nestabilne suspenzije bez obzira na upotrijebljeni stabilizator.

Lestari i suradnici (69) su ispitali utjecaj različitih stabilizatora na nanosuspenzije pripremljene vlažnim mljevenjem. Istraživanje su proveli na šest djelatnih tvari različitih svojstava, a došli su do zaključka da anionski surfaktanti u koncentraciji iznad kritične micelarne koncentracije (CMC) djelotvorno stabiliziraju nanosuspenzije veličine čestica < 250 nm dobivene vlažnim mljevenjem. To objašnjavaju jačom pokrivenošću čestica molekulama surfaktanta, pri čemu suvišak molekula formira micle koje služe kao spremnik iz kojih se molekule surfaktanta otpuštaju prema potrebi. Također su opazili da anionski surfaktanti s višom CMC vrijednošću bolje stabiliziraju nanosuspenziju. Nadalje, kationski surfaktanti nisu osiguravali stabilnost nanosuspenzija jer se njihov pozitivni naboj neutralizira negativnim nabojem molekula većine djelatnih tvari.

Lee i suradnici (65) su ispitali utjecaj strukture ambifilnih aminokiselinskih kopolimera na stabilnost nanosuspenzije naproksena pripremljene vlažnim mljevenjem. Kopolimere su gradili s lizinom kao hidrofobnim segmentom i fenilalaninom, alaninom ili leucinom kao hidrofilnim segmentima. Varirali su molekulsku masu kopolimera (5-25 kDa), strukturu (nasumično smješteni hidrofilni i hidrofobni segmenti naspram diblok polimera pravilne strukture) te udio lizina u kopolimeru. Došli su do zaključka da hidrofobnost kopolimera ima veći utjecaj na pripremu nanosuspenzije nego njegova morfologija te da je za učinkovitu stabilizaciju adsorpcijom na nanokristale djelatne tvari udio hidrofobnih segmenata treba biti najmanje 15 % u molnom udjelu.

Nadalje, Esfandi i suradnici (37) su pokazali na primjeru mikrokristalinične celuloze kako polimerni stabilizatori veće molekulske mase pružaju bolju steričku stabilizaciju

nanosuspencijama od onih manje molekulske mase. Isto vrijedi i za neionske surfaktante, što su pokazali Mohyeldin i suradnici (33) na suspenciji ibuprofena te Cerdeira i suradnici (70) na nanosuspencijama mikonazola i itraconazola. Obje skupine autora su ispitale utjecaj poloksamera 188 i poloksamera 407 na stabilizaciju nanosuspencija. Došli su do opažanja da poloksamer 407 bolje sterički stabilizira nanosuspencije, jer zbog veće molekulske mase potpunije prekriva nanokristalne čestice od poloksamera manje molekulske mase.

Verma i suradnici (71) su veličine čestica nanosuspencija korelirali s HLB vrijednosti stabilizatora u procesu precipitacije i s topljivošću djelatne tvari u stabilizatoru u procesu mikrofluidizacije.

Učinkovitost stabilizatora se najčešće procjenjuje mjerenjem veličine čestica, indeksa polidisperzije i zeta potencijala, odmah po pripremi te nakon određenog vremena skladištenja na kontroliranim uvjetima. Međutim, postoje i primjeri korištenja mikroskopskih ili spektroskopskih metoda u odabiru stabilizatora. Tako su Cerdeira i suradnici (72) razvili metodu bliske infracrvene spektroskopije (NIR) za kvantifikaciju adsorbiranog natrij laurilsulfata (NaLS) i hidroksipropil celuloze (HPC) u nanosuspenciji mikonazola. Verma i suradnici (73) su za nanosuspenciju ibuprofena u izboru stabilizatora koristili tehniku mikroskopije atomskom silom (AFM). Slike su pokazale jaku adsorpciju hidroksipropilmetil celuloze i hidroksipropil celuloze i nedovoljnu adsorpciju poloksamera i polivinilpirolidona.

4.2.2. Prevođenje nanosuspencija u čvrsto stanje

Postupak prevođenja nanosuspencije u čvrsto stanje provodi se u slučaju kad se nanokristali djelatne tvari ugrađuju u neki oralni dozirni oblik (npr. u tabletu ili kapsulu) ili za postizanje bolje stabilnosti proizvoda ako nije moguće pripremiti stabilnu nanosuspenciju (66). Najčešće se postupak provodi sušenjem raspršivanjem ili smrzavanjem, granulacijom i peletelizacijom. Pri tome je vrlo važno da se veličina čestica posušenog materijala ne razlikuje značajno od

veličine čestica nanokristala djelatne tvari u polaznoj nanosuspenziji, kako bi se nakon redispergiranja osigurala *in vivo* djelotvornost i sigurnost primjene. Za sprječavanje rasta kristala i agregacije koje se mogu dogoditi tijekom prevođenja u čvrsti oblik, nanosuspenzija se nanosi na nosače (eng. *matrix formers*). Kao nosači se najčešće koriste šećeri (laktoza (58), saharoza (74)), šećerni alkoholi (manitol (70; 58; 31), ksilitol (53), sorbitol) ili polimeri (PEG, mikrokristalinična celuloza (74; 70)). Kumar i suradnici (75) su pokazali da su šećeri male molekulske mase (disaharidi i šećerni alkoholi) bolji nosači za sušenje raspršivanjem i smrzavanjem nanosuspenzije indometacina od polisaharida.

Van Eerdenbrugh i suradnici (76) su ispitali utjecaj načina sušenja nanosuspenzija devet modelnih molekula na brzinu oslobađanja pri uvjetima neosigurane topljivosti. Nanosuspenzije devet modelnih molekula su pripremili metodom vlažnog mljevenja, a sušili su ih raspršivanjem i smrzavanjem bez dodatka nosača. Profili oslobađanja za neke molekule nisu razlikovali nanosuspenzije od prašaka posušenih raspršivanjem ili smrzavanjem, dok je kod pojedinih molekula došlo do smanjenja brzine oslobađanja prašaka u odnosu na nanosuspenziju. Nadalje su pokazali da profili oslobađanja ne ovise o načinu sušenja nanosuspenzije. Predloženo objašnjenje rezultata vezano je za hidrofobnost površine čestica, što se može korelirati s lipofilnošću molekula. Aglomerati koje stvaraju manje hidrofobne čestice se lakše deaglomeriraju u vodi i nemaju značajan utjecaj na brzinu oslobađanja, dok hidrofobnije čestice stvaraju jače aglomerate koji se ne mogu reaglomerirati, zbog čega dolazi do pada profila oslobađanja. Posljedično, za redispergiranje više hidrofobnih čestica u vodi nužan je dodatak nosača prije sušenja, dok se manje hidrofobne čestice mogu sušiti i bez nosača. Nadalje, Malamatar i suradnici (77) su ispitali resuspendibilnost nanosuspenzija indometacina posušenih raspršivanjem sa i bez nosača manitola i L-leucina, te su također pokazali da sušenjem bez nosača dolazi do ireverzibilne aglomeracije, dok se dodatkom nosača veličina čestica i indeks polidisperzije ne mijenjaju sušenjem.

Dong i suradnici (78) su pokazali kako se i glina može koristiti kao učinkovit nosač u sušenju raspršivanjem nanosuspenzije fenofibrata zbog velike površine čestica. Osim toga, ona ne utječe na reološka svojstva nanosuspenzije pa ne dolazi do začepjenja otvora kroz koji se nanosuspenzija raspršuje.

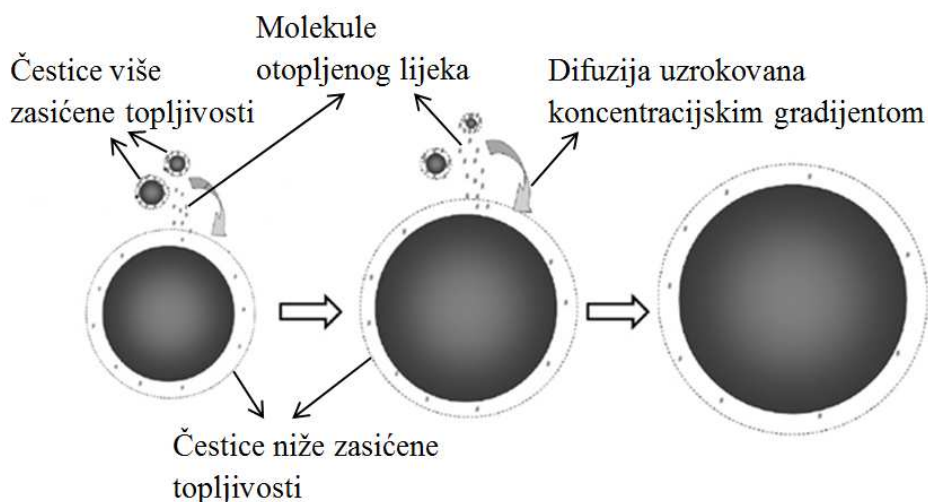
Bose i suradnici (58) su ispitali farmakokinetički odziv nanosuspenzije i prevedene u čvrstu tvar raspršivanjem u odnosu na suspenziju iste djelatne tvari. Pokazali su da je bioraspoloživost obje nanoformulacije znatno bolja nego bioraspoloživost suspenzije, te da nema statistički značajne razlike u *in vivo* djelotvornosti između nanosuspenzije i posušenog praška. Figueroa i Bose (59) su dodatno za istu djelatnu tvar ispitali utjecaj različitih načina raspršivanja nanosuspenzije tijekom granulacije raspršivanjem (*top spray* i *bottom spray*) na *in vivo* ponašanje. Autori su utvrdili da je vidljiv trend u porastu vremena potrebnog da se postigne vršna koncentracija lijeka u plazmi (t_{max}) od nanosuspenzije prema *bottom spray* prašku. To objašnjavaju manjom poroznosti čestica koje nastaju *bottom spray* sušenjem zbog čega je dulje vrijeme potrebno za raspad granula. Iako za ispitanu djelatnu tvar t_{max} nije utjecao na bioraspoloživost i nema statistički značajne razlike u apsorpciji djelatne tvari iz prašaka i nanosuspenzije, razlike u poroznosti čestica za dva načina granulacije bi mogle imati utjecaja na lijekove koji se brže apsorbiraju, te bi za takve lijekove granulacija *top spray* sušenjem bila bolji izbor.

4.2.3. Fizikalna stabilnost

Fizikalna nestabilnost nanosuspenzija se opaža kroz procese raslojavanja (sedimentacija ili izlučivanje na površinu (eng. *creaming*)), aglomeracije/agregacije, rasta kristala (Ostwaldovo zrenje) i promjenom kristalnog oblika, a vezana je uglavnom za način pripreme i odabir stabilizatora (79). Nestabilni visokoenergetski sustavi poput nanosuspenzija energiju sustava nastoje smanjiti (i) spajanjem više manjih čestica u veće ili (ii) rastom kristala.

Brownovo gibanje čestica u nanosuspenzijama dovodi do sudara čestica, pri čemu se mogu ostvariti slabe van der Waalsove sile ili prave kemijske veze. Aglomeracija je reverzibilni proces, a agregacija ireverzibilni. Navedeni procesi se mogu odvijati tijekom pripreme nanosuspenzija, tijekom čuvanja ili transporta.

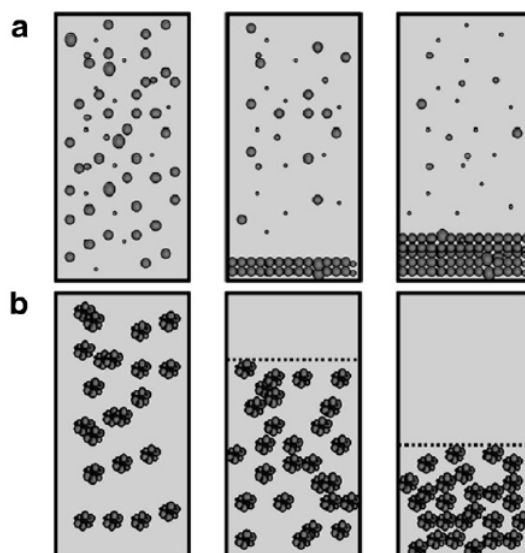
Ostwaldovo zrenje ili rast kristala je rast velikih čestica na račun manjih čestica. Čestice različite veličine imaju različitu topljivost prema Ostwald-Freundlichovoj jednadžbi (5). Manje čestice imaju višu topljivost od većih čestica, što rezultira koncentracijskim gradijentom između manjih i većih čestica. Molekule difundiraju iz područja više koncentracije oko manjih čestica u područje niže koncentracije oko većih čestica, stvara se lokalno prezasićenje oko većih čestica i molekule kristaliziraju na većim česticama. Oko manjih čestica je, zbog difuzije otopljene tvari, nezasićena otopina te se manje čestice dodatno otapaju. Proces se ponavlja sve dok se male čestice potpuno ne otope, kao što je prikazano na Sliku 4.



Slika 4 Ostwaldovo zrenje ili rast kristala (preuzeto iz (66))

Do procesa rasta kristala dolazi ako je široka raspodjela veličine čestica nanosuspenzije, jer u sustavu tada postoje manje čestice koje se mogu otapati i veće koje mogu uslijed toga rasti. Uska raspodjela veličine čestica inhibira pojavu Ostwaldovog zrenja. Odabir stabilizatora također može značajno utjecati na rast kristala, jer dobro odabrani stabilizator, u koncentraciji pri kojoj ne utječe na topljivost djelatne tvari, smanjuje međupovršinsku napetost između čestica kristala i disperzijskog sredstva. Nadalje, istraživanje van Eerdenbrugha (76) na devet modelnih molekula je pokazalo da je rast kristala manji pri nižoj temperaturi, što ne iznenađuje s obzirom da se proces temelji na temperaturno ovisnom procesu otapanju manjih čestica.

Opisani procesi aglomeracije/agregacije i rasta kristala nadalje uzrokuju izdvajanje faza bilo u obliku sedimentacije (taloženja) ili izlučivanja na površinu formulacije. Do izdvajanja faza može doći ako se gustoća čestica djelatne tvari razlikuje od gustoće disperzijskog sredstva. Izjednačavanje gustoća se postiže ili smanjenjem veličine čestica kristala ili povećanjem viskoznosti nanosuspenzije. Flokulacija je izdvajanje koloidnih čestica nakupljanjem u nakupine čestica do veličine pri kojoj dolazi do taloženja. Na Slika 5 prikazano je ponašanje flokulirane i deflokulirane nanosuspenzije. U deflokuliranoj suspenziji (a) pojedinačne čestice sedimentiraju malom brzinom, a nastali talog je vrlo gusto pakiran zbog tlaka koji se vrši na svaku pojedinu česticu. Taj je talog vrlo teško redispergirati. U flokuliranoj suspenziji (b), čestice su prisutne u nakupinama koje, s obzirom da su teže od pojedinačnih čestica, sedimentiraju većom brzinom. Zbog veće brzine sedimentacije, u talogu se čestice ne zbijaju gusto jer zbog veće brzine sedimentacije talog sadrži zarobljeni medij. Dakle, nastali talog je rahliji i puno lakše se redispergira mućkanjem.



Slika 5 Sedimentacija u (a) deflokuliranoj suspenziji (b) flokuliranoj suspenziji
(preuzeto iz (66))

Nadalje, jedan od bitnih parametara koji utječu na stabilnost, topljivost, brzinu oslobađanja i *in vivo* djelotvornost nanokristala djelatne tvari je i njihov kristalni oblik u nanosuspenziji. Amorfni oblik je nestabilan i s vremenom prelazi u neki od stabilnijih kristalnih oblika. Brzina i potpunost prijelaza ovise o temperaturi, disperzijskom sredstvu, stabilizatorima i prisutnosti kristalnih jezgri (66). Utjecaj kristalnih jezgri na prijelaz iz amornog stanja može se objasniti slično kao i proces Ostwaldovog zrenja. Kao nestabilniji oblik, amorf je topljiviji od stabilnijeg kristalnog oblika. Zbog razlike u termodinamičkoj topljivosti amornog i kristalnog oblika, amorfne čestice se otapaju više nego kristalne i otopljena tvar kristalizira u stabilniji oblik. Istraživanja su pokazala da brzom kristalizacijom, koja se odvija u postupku taloženja, uglavnom nastaju amorfne nanosuspenzije (31; 34; 40; 37; 57) ili se kristalni oblik mijenja u manje stabilni (35), iako je zabilježeno da se i tim procesima kristalno stanje može djelomično ili potpuno zadržati (18; 43). Metodama smanjenja veličine čestica nanokristala djelatne tvari kristalno stanje se uglavnom mijenja samo djelomično ili se zadržava početni

kristalni oblik. Nadalje, postupcima prevođenja nanosuspenzija u čvrsto stanje, kao što su sušenje raspršivanjem ili smrzavanjem, nastaju uglavnom amorfni oblici.

4.2.4. Kemijska stabilnost

Dok je fizikalna stabilnost vezana prvenstveno uz odabir odgovarajućeg stabilizatora, kemijska je stabilnost nanosuspenzija vezana za molekulsku strukturu djelatne tvari (prisutnost određenih funkcionalni skupina i sklonost oksidaciji, hidrolizi itd.). Nanosuspenzije su općenito kemijski stabilnije od odgovarajućih otopina zbog ograničene topljivosti nanokristala djelatne tvari u disperzijskom sredstvu (66). Međutim, u slučaju kemijski nestabilnih molekula, njihova se stabilnost može poboljšati dodatkom odgovarajućih stabilizatora. Dodatkom stabilizatora su Gao i suradnici (41) objasnili poboljšanu kemijsku stabilnost kvercetina u nanosuspenzijama pripremljenih taloženjem uz otparavanje otapala i visokotlačnom homogenizacijom u odnosu na kemijsku stabilnost vodene otopine kvercetina. Nadalje, kako se razgradnja kristalne čestice može odvijati samo na površini kristala, autori pretpostavljaju da se oko kristalne čestice stvara zaštitni sloj sačinjen od razgradnih produkata, koji štiti česticu od daljnje razgradnje. Kumar i Burgess (49) su proučavali utjecaj stabilizatora na kemijsku stabilnost naproksena. Nanosuspenzije naproksena su pripremili vlažnim mljevenjem uz stabilizatore Tween 80 i HPMC E15. Dok je kemijska stabilnost sustava naproksen-Tween 80 zadovoljavajuća, u sustavu naproksen-HPMC E15 dolazi do razgradnje. Autori to objašnjavaju nastankom jakih interakcija kristalnih čestica s HPMC, što nadalje izaziva narušavanje kristalne rešetke i amorfizaciju površine, a kako je amorfni naproksen reaktivniji od kristalnog, dolazi do razgradnje.

4.3. Metode karakterizacije nanokristala djelatne tvari

Karakterizacija nanokristala djelatne tvari obuhvaća ispitivanje veličine čestica, raspodjele veličine čestica i indeksa polidisperzije, morfologije čestica, zeta-potencijala (površinskog naboja čestica), kristalnog oblika, sedimentacije i kemijske stabilnosti nanosuspenzija te topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala. Dodatno se kod suspenzija za parenteralnu primjenu ispituje sterilnost i prisutnost pirogena ili bakterijskih endotoksina. Ako se nanosuspenzija prevodi u čvrsto stanje, bitan parametar je redisperzibilnost u vodi ili medijima koji simuliraju gastrointestinalne tekućine, koji ukazuje da li se veličina nanokristala djelatne tvari povećala nakon sušenja nanosuspenzije i raspršenja u vodenom mediju (9; 66).

4.3.1. Veličina i morfologija čestica

Veličina čestica i raspodjela veličine čestica određuje se spektroskopskim metodama, brojenjem i metodama razdvajanja. Bez obzira na velik broj metoda, i dalje se za karakterizaciju nanokristala djelatne tvari određivanjem veličine čestica i njihove distribucije najčešće upotrebljavaju spektroskopske metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, eng. *dynamic light scattering*) i laserske difrakcije (DL, eng. *laser diffraction*) te metoda električnog brojenja (eng. *coulter counter*).

Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (poznatom još i pod nazivom spektroskopija fotonske korelacije – PCS, eng. *photon correlation spectroscopy*) mjeri se Brownovo gibanje čestica promjenama u intenzitetu raspršenog svjetla laserske zrake i konvertira u veličinu čestice. Brownovo gibanje je nasumično kretanje čestica zbog sudara s molekulama otapala. Brzina gibanja čestica ovisi o njihovoj veličini, jer će sudari s molekulama otapala imati veći

utjecaj na male čestice nego na velike, pa će i brzina biti veća što je čestica manja. Nadalje, brzina ovisi o temperaturi jer ona utječe na viskoznost tekućine. Brzina Brownovog gibanja čestica definirana je translacijskim difuzijskim koeficijentom (D), iz kojeg se veličina čestica izračunava korištenjem Einstein-Stokesove jednadžbe:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

gdje je:

$d(H)$ = hidrodinamički promjer

k = Boltzmannova konstanta

T = apsolutna temperatura

D = translacijski difuzijski koeficijent

η = viskoznost

Hidrodinamički promjer koji se mjeri ovom tehnikom je vrijednost koja govori kako čestica difundira unutar tekućine, a odnosi se na promjer sfere koja ima isti translacijski koeficijent difuzije kao čestica. Translacijski difuzijski koeficijent i prividna veličina čestica će dodatno ovisiti o ionskoj jakosti medija (jer se povećanjem ionske jakosti medija smanjuje debljina električnog dvosloja), kao i o strukturi površine čestice (konformacija adsorbiranog polimera) (80).

Ovom metodom se određuje srednja veličina čestica i indeks polidisperzije (PDI), koji govori o širini raspodjele veličine čestica. Vrijednost PDI u rasponu 0.1 – 0.25 ukazuje na usku, a iznad 0.5 na široku raspodjelu veličine čestica (66). Metoda je primjenjiva samo na tekuće uzorke. Raspon mjerenja je dosta ograničen (do 2 μm), pa se prilikom mjerenja ne mogu točno odrediti smetnje mikročestica u nanosuspenziji.

Metoda laserske difrakcije se temelji na tome da će čestice prolazeći kroz lasersku zraku raspršiti svjetlo pod kutom koji je proporcionalan njihovoj veličini. Smanjenjem veličine čestica se povećava promatrani kut raspršenja svjetlosti. Intenzitet raspršenja ovisi o veličini čestica i smanjuje se s volumenom čestice. Veće čestice zato raspršuju svjetlost pod oštrim kutovima s višim intenzitetom, dok manje čestice raspršuju svjetlost pod širim kutovima, ali s niskim intenzitetom. Optički model se koristi za interpretaciju podataka o raspršenju i izračun raspodjela veličine čestica. Raspon mjerenja ovisi o primijenjenom optičkom modelu. Korištenjem Fraunhoferovog optičkog modela mjere se vrijednosti u rasponu 2 – 8000 μm , dok se ispod 2 μm preporuča model raspršenja koji koristi Mie teoriju. Tehnika je primjenjiva i na tekuće i praškaste uzorke. Tom metodom se mjere vrijednosti LD50, LD90 i LD99, koje govore o 50, 90 i 99% čestica ispod navedene vrijednosti.

Za razliku od metode laserskog raspršenja, koja daje relativnu raspodjelu veličine čestica, metodom električnog brojenja mjere se apsolutne vrijednosti broja čestica određene veličine po jedinici volumena suspenzije (66). Načelo rada ove tehnike je propuštanje razrijeđene suspenzije nevodljivih čestica u elektrolitu kroz otvor određenih dimenzija (mjerno područje). Promjene u otporu između dvije elektrode na objema stranama otvora dok čestice prolaze povezane su s volumenima čestica jer svaka nevodljiva čestica zauzima svoj volumen istisnutog elektrolita. Zamjena u volumenu prikazuje se kao signal čija je visina proporcionalna volumenu čestice. Ova je tehnika korisna za karakterizaciju nanosuspenzija koje se primjenjuju intravenski jer je promjer najmanjih krvnih kapilara oko 5 μm (6), pa je broj većih čestica potrebno zadržati ispod navedene vrijednosti kako bi se osigurala sigurna primjena lijeka.

Evaluacija morfologije čestica i dalje se provodi različitim mikroskopskim tehnikama, kao što su optička mikroskopija, pretražna elektronska mikroskopija (SEM, eng. *scanning electrone microscopy*), transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM, eng. *transmission electrone microscopy*) i mikroskopija atomskih sila (AFM, eng. *atomic force microscopy*).

Optički mikroskop za stvaranje uvećane slike uzorka koristi snop svjetlosti, što ukazuje na ograničenu razlučivost u submikronskom području, pa se ova tehnika uglavnom primjenjuje za procjenu efikasnosti stabilizatora korištenih u nanokristalima djelatne tvari (sprječavanje agregacije čestica), a rjeđe za karakterizaciju veličine primarnih čestica.

Elektronski mikroskopi za stvaranje uvećane slike koriste valna svojstva snopa elektrona, a mala duljina vala elektrona omogućava bolju moć razlučivanja. Transmisijaska elektronska mikroskopija se temelji na prolasku elektrona kroz uzorak, pri čemu dolazi do raspršenja elektrona na atomima razmjerno debljini i gustoći područja na koje nailaze, a elektronsku sliku uzorka čine neraspršeni elektroni. Pretražna elektronska mikroskopija se temelji na pomicanju snopa elektrona po površini uzorka, pri čemu dolazi do raspršivanja elektrona na uzorku ili emisije elektrona iz elektronskog omotača atoma s površine uzorka (stvaranje tzv. sekundarnih elektrona). Elektronsku sliku uzorka čine raspršeni i sekundarni elektroni, a može govoriti o topografiji i sastavu površine. Mikroskopijom atomskim silama se mjere međuatomske sile između šiljka probe i površine uzorka. Uzorak se nalazi na nosaču koji se može gibati u svim smjerovima, a pomaci poluge sa šiljkom se bilježe što omogućava stvaranje topografske slike površine uzorka.

Za karakterizaciju nanosuspenzija prema veličini čestica i raspodjeli veličine čestica najčešće se koriste najmanje dvije metode, od kojih je barem jedna spektroskopska (DLS ili DL), a druga mikroskopska kako bi se utvrdila agregacija ukoliko se odvija.

4.3.2. Površinski naboj čestica (zeta potencijal)

U poglavlju 4.2 Stabilizacija suspenzija nanokristala djelatnih tvari prikazana je struktura električnog dvosloja nabijenih čestica. Sternov sloj je sloj suprotno nabijenih iona koji čvrsto priliježu na površinu. Difuzijski (Gouy-Chapmanov) sloj je sloj u kojem se ioni istog i suprotnog predznaka mogu slobodno kretati. U električnom polju će se nabijene dispergirane čestice gibati prema elektrodi suprotnog predznaka, a zajedno s njima i Sternov sloj i dio difuzijskog sloja. Ta se pojava naziva elektroforetska pokretljivost čestica. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja naziva se elektrokinetički zeta potencijal, a metoda mjerenja zeta potencijala Laser Doppler elektroforeza.

Zeta potencijal ukazuje na stabilnost nanočestica jer se čestice istog naboja odbijaju. Za elektrostatski stabilizirane nanosuspenzije, izmjerene apsolutne vrijednosti zeta potencijala iznad 60 mV ukazuju na vrlo stabilnu suspenziju, oko 20-30 mV na prihvatljivu stabilnost suspenzije, a ispod 5 mV na brzu agregaciju čestica (66). Nanosuspenzije stabilizirane elektrostatski i sterički s iznosom apsolutne vrijednosti zeta potencijala od 20 mV smatraju se stabilnima (68).

Iako se mjerenjem površinskog naboja čestice najčešće procjenjuje stabilnost nanosuspenzija zbog međusobnog odbijanja čestica, zabilježena je i primjena metode u procjeni učinkovitosti adsorpcije mukoadhezivnih kationskih polimera na negativno nabijene nanočestice (8).

4.3.3. Izdvajanje faza i redisperzibilnost

Izdvajanje faza u nanosuspenzijama (sedimentacija i izlučivanje) se procjenjuje prvenstveno vizualno. Nadalje, za kvantitativnu procjenu stabilnosti nanosuspenzije može se mjeriti volumen sedimentacije/flokulacije, kao bezdimenzijska veličina kojom se izražava omjer

volumena sedimentirane ili flokulirane faze u odnosu na ukupni volumen suspenzije kroz vrijeme.

Ispitivanje redisperzibilnosti nanokristala djelatne tvari, nakon prevođenja nanosuspenzije u čvrsti oblik, provodi se mućkanjem u vodenim medijima te mjerenjem veličine čestica, indeksa polidisperzije i zeta potencijala, kako je opisano u prethodnim poglavljima.

4.3.4. Kristalni oblik

Polimorfi su različiti kristalni oblici iste supstancije u kojoj molekule imaju različit raspored i/ili konformaciju molekula unutar kristalne rešetke te stoga i posjeduju različite fizikalno-kemijske karakteristike. Različite kristalne strukture u polimorfima se pojavljuju kad supstancija kristalizira tako da su joj molekule složene različito unutar kristalne rešetke. Do toga dolazi zbog utjecaja različitih farmaceutskih postupaka u proizvodnji, kao što su liofilizacija, sušenje, sušenje raspršivanjem, mljevenje, usitnjavanje, vlažna granulacija ili komprimiranje.

Utvrđivanje kristalnog oblika nanokristala djelatne tvari bitno je jer kristalni oblik djelatne tvari utječe na topljivost i brzinu oslobađanja, a time i na *in vivo* učinak. Amorfni oblici su nestabilni i s vremenom mogu prijeći u stabilniji (tj. slabije topljiv) oblik, što može značajno promijeniti *in vivo* ponašanje lijeka. Prijelaz u stabilniji oblik može se usporiti odgovarajućim stabilizatorima. Ispitivanje kristalnog oblika se provodi diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC, eng. *differential scanning calorimetry*) i difrakcijom rendgenskih zraka (XRD, eng. *X-Ray diffraction*).

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je termoanalitička tehnika ispitivanja termalnih svojstava tvari, a temelji se na zagrijavanju ili hlađenju ispitivanog i referentnog uzorka programiranom brzinom u kontroliranoj atmosferi. Izmjerena razlika dovedene energije u

ispitivani i referentni uzorak bilježi se kao funkcija temperature pri izlaganju kontroliranom temperaturnom programu u obliku pikova na DSC krivulji, a govori o endotermnim ili egzotermnim promjenama koje se događaju u ispitivanom uzorku, kao što su taljenje, kristalizacija i staklasti prijelaz. Kako su temperature pri kojima se odvijaju navedene promjene karakteristične za određene tvari, ova tehnika je primjenjiva za procjenu fizikalne stabilnosti tijekom pripreme ili skladištenja. Diferencijalna pretražna kalorimetrija može pratiti polimorfne prijelaze. Tijekom pripreme može doći do zadržavanja kristalnog oblika ili djelomičnog ili potpunog prijelaza u amorfni oblik, a skladištenjem ljekovitog oblika koji sadrži djelatnu tvar u kristalnom ili amorfnom obliku, može doći do kristalizacije stabilnijeg oblika. Različiti kristalni oblici imaju različitu točku taljenja pa je metoda jednostavna i jeftina za identifikaciju određenog kristalnog oblika. Brzina snimanja uzorka je kod diferencijalne pretražne kalorimetrije značajan parametar, jer o njoj ovisi kako će se ponašati uzorak, te da li će se vidjeti svi termalni događaji. Uobičajena brzina snimanja je oko 5 -10°C /min, ali je kod npr. liofiliziranih uzoraka koji su osjetljiviji, potrebno tu brzinu smanjiti na oko 0.5 -1°C/min (81).

Difrakcija rendgenskih zraka je najvažnija tehnika analize kristalne strukture tvari. Rendgensko zračenje je vrsta elektromagnetskog zračenja visoke frekvencije i energije, valnih duljina od 10 nm do 1 pm, istog reda veličine kao i razmak susjednih atoma u kristalu. Kada zraka monokromatskog rendgenskog zračenja padne na uzorak, dolazi do raspršenja zračenja na pojedinim elektronskim oblacima atoma. U određenim smjerovima raspršeni valovi se interferentno pojačavaju. Prostorni raspored difrakcijskih maksimuma strogo ovisi o prostornoj periodičnosti atoma u kristalu, odnosno o njenoj kristalnoj rešetki. Intenziteti difrakcijskih maksimuma ovise o vrsti atoma u kristalnoj rešetki i o njihovom međusobnom prostornom rasporedu u skladu sa zahtjevima simetrije, dakle ovise o kristalnoj strukturi tvari.

Zakretanjem uzorka i detektora, tj promjenom upadnog kuta zračenja Θ , bilježi se intenzitet raspršenog zračenja u ovisnosti o kutu zakretanja. Budući da položaj difrakcijskih maksimuma ovisi o geometriji ćelije, a njihov intenzitet o broju, vrsti i položaju atoma, znači da svaka tvar daje karakterističan difraktogram. Očito je da se rentgenskom difrakcijom jednostavno može razlikovati amorfna tvar od kristalne, odnosno utvrditi udio amorfne tvari u smjesi, kao i razlikovati različite kristalne oblike nanokristala djelatne tvari te kvantitativno odrediti udio pojedinog kristalnog oblika u smjesi (82).

Za karakterizaciju nanokristala djelatnih tvari često se koriste obje metode za potvrdu kristalnog oblika.

4.3.5. Kemijska stabilnost

Kvantitativno određivanje razgradnih onečišćenja najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, eng. *High Performance Liquid Chromatography*), ponekad spregnutom sa spektrometrijom masa ukoliko se provodi strukturna karakterizacija onečišćenja.

4.3.6. Topljivost

Topljivost je, uz brzinu oslobađanja, jedan od glavnih faktora koji utječu na *in vivo* učinkovitost lijeka, a njihovim se poboljšanjem može utjecati na bolju apsorpciju lijeka. Utjecaj veličine čestica na topljivost djelatne tvari opisan je Ostwald-Freundlichovom jednadžbom. Određivanjem topljivosti u pretformulacijskim ispitivanjima u razvoju proizvoda postižu se vrijedne informacije kojima se može predvidjeti željeno *in vivo* poboljšanje. Zbog toga je vrlo važno razviti metode kojima se postižu točni i precizni rezultati. Međutim, bez

obzira na povećan interes za terapijske nanosustave posljednjih godina, još uvijek ne postoje ustaljeni postupci za određivanje topljivosti nanokristala djelatne tvari i ostalih nanočestica. Ispitivanje topljivosti djelatne tvari konvencionalne veličine čestica iznad 1 μm najčešće se provodi metodom zasićene otopine, koja se temelji na dodatku tvari kojoj se ispituje topljivost u suvišku u medij (primjerice vodeni pufer). Ravnoteža sustava postiže se trešnjom pri određenoj temperaturi, a obično se ispituje nakon 24 i 48 sati. Kod tvari koje mogu ionizirati važno je održavati pH medija konstantnim. Otopljena tvar se fizički odvaja filtriranjem, centrifugiranjem ili ultracentrifugiranjem i kvantificira spektroskopskim (najčešće UV spektrofotometrijom) ili separacijskim metodama (HPLC) (83).

Ispitivanje topljivosti nanosustava provodi se također opisanom metodom, ali s naglaskom na korak separacije otopljene od neotopljene tvari i kvantifikacije otopljene tvari. Naime, dok kod konvencionalnih sustava prilikom filtriranja može doći do adsorpcije djelatne tvari na filtar, kod nanosustava osim adsorpcije postoji i mogućnost prolaska neotopljenih čestica kroz pore filtra. Za točnu evaluaciju topljivosti nanokristala djelatne tvari, preporuka je odjeljivati otopljenu od neotopljene tvari filtriranjem na filtre veličine pora $\leq 0.1 \mu\text{m}$ (84). Međutim, i dalje se najčešće koriste filtri veličina pora 0.45 μm i 0.2 μm jer je filtriranje na vrlo male veličine pora (0.1 μm ili manje) tehnički dosta zahtjevno i lako dolazi do začepjenja pora. S druge strane, filtriranjem na veće veličine pora postoji mogućnost propuštanja neotopljenih čestica. Murdande i suradnici (85) su pokazali da se začepljenje filtara malih veličina pora može umanjiti primjenom ultracentrifugiranja otopina, a zatim filtriranjem supernatanta. Nadalje, centrifugiranje i ultracentrifugiranje neobrađenih suspenzija je jednostavnije jer su čestice veće i teže, pa se lakše mogu odvojiti na ovaj način. Kod nanosustava separacija je ovim postupkom, ako je i prikladna, dosta dugotrajna, jer nanočestice imaju tendenciju ostati suspendirane u otopini, čak i nakon centrifugiranja. Ultracentrifugiranjem nanokristala može doći i do adsorpcije otopljene tvari na kivetu za centrifugiranje, a s obzirom na dugo trajanje,

može doći i do dodatnog otapanja čestica. Dakle, bez obzira na primijenjeni način separacije, može doći do nepotpunog odvajanja otopljene i neotopljene frakcije što može dovesti do prividno viših rezultata topljivosti. Za slabo topljive tvari, čak i kad se radi o malo precijenjenim vrijednostima, utjecaj na konačne rezultate može biti vrlo velik. Literaturni navodi za ispitivanje topljivosti nanokristala su često nejasni i nedovoljno objašnjeni, pa ih treba uzimati s rezervom. Neki od primjera gdje je topljivost puno više povećana u odnosu na povećanje koje bi se predvidjelo iz Ostwald-Freundlichove jednadžbe (10 - 15%) su nanosuspenzija febukostata (50), kurkumina (43) i simvastatina (18). Metode odjeljivanja u tim ispitivanjima su filtriranje na filtre veličine pora 0.22 μm i ultracentrifugiranje. Povećanje topljivosti u navedenim primjerima djelatnih tvari, kojima u procesu pripreme nanosuspenzije nije promijenjen kristalni oblik, objašnjava se utjecajem stabilizatora na močljivost i topljivost nanokristala djelatne tvari. Međutim, samo je u slučaju febukostata potvrđen utjecaj stabilizatora na topljivost neobrađene djelatne tvari, dok je za ostale primjere utjecaj stabilizatora i dalje nepotvrđena pretpostavka.

Općenito se korak separacije otopljene frakcije u ispitivanju topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala može izbjeći *in situ* kvantifikacijom djelatne tvari, metodama mjerenja apsorpcije optičkim vlaknima, mjerenja zamućenja ili raspršenja svjetlosti, kalorimetrijom i potenciometrijom.

Van Eerdenbrugh i suradnici (86) su na primjeru nanosuspenzije felodipina proveli ispitivanje utjecaja veličine čestica i koncentracije na *in situ* mjerenje apsorpcije svjetlosti optičkim vlaknima. Došli su do zaključka da na mjerenje apsorpcije pomoću optičkih vlakana utječu i raspršenje svjetlosti na neotopljenim česticama te apsorpcija otopljenih i neotopljenih submikronskih čestica.

Van Eerdenbrugh i suradnici (87) su proveli ispitivanje topljivosti nanosuspenzija itrakonazola, lovirida, fenitoina i naproksena, s posebnim naglaskom na korak separacije i kvantifikaciju. Za odvajanje otopljene frakcije od neotopljene djelatne tvari u obliku nanokristala, uspoređivali su filtriranje na PVDF filtre veličine pora 0.1 μm , centrifugiranje i ultracentrifugiranje, uz kvantifikaciju spektrofotometrijski, a za *in situ* kvantifikaciju djelatnih tvari mjerenje raspršenja svjetlosti i zamućenja (turbidimetrija). Autori su pokazali da niti jedan od tri ispitana načina separacije nije potpuno prihvatljiv za ispitivanje topljivosti nanokristala djelatne tvari zbog nepotpunog razdvajanja otopljene i neotopljene frakcije. Predlažu ispitivanje topljivosti metodama koje uključuju *in situ* mjerenja poput mjerenja zamućenja ili raspršenja svjetlosti jer se na taj način izostavlja korak separacije. Rezultati ispitivanja topljivosti nanosuspenzija određenih metodama centrifugiranja, ultracentrifugiranja i filtriranja su višestruko viši od topljivosti neobrađenih suspenzija, dok su *in situ* mjerenjima rezultati tek 10-15% viši od topljivosti neobrađenih suspenzija, što je u skladu s izračunom prema Ostwald-Freundlichovoj jednadžbi.

Nadalje, Anhalt i suradnici (88) su razvili *in situ* metodu za ispitivanje topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari u obliku nanokristala koristeći metodu dinamičkog raspršenja svjetlosti. Za razliku od ostalih metoda, gdje se kvantifikacija temelji na mjerenju nekog svojstva otopljene tvari, ovom metodom se mjeri raspršena svjetlost na neotopljenim česticama i služi za izračun koncentracije otopljene tvari u sustavu.

Kayaert i suradnici (89) su razvili kalorimetrijsku metodu *in situ* kvantifikacije oslobođene djelatne tvari, koja se temelji na mjerenju promjene temperature sustava. Metoda je primjenjiva za ispitivanje brzog oslobađanja, ali nedostaci su dugo vrijeme stabilizacije te mjerenje sveukupne topline sustava što zahtjeva pažljiv razvoj metode.

Dok je za neke od navedenih metoda već ispitana primjenjivost na nanokristalne formulacije (88; 87; 90), za metode poput potenciometrijskog mjerenja ion-selektivnim elektrodama

dosad je ispitana primjenjivost na konvencionalnim sustavima (91; 92; 93) i trenutno ne postoje literaturni navodi o korištenju potenciometrije za određivanje koncentracije otopljene djelatne tvari u nanokristalnim sustavima. Međutim, kako se ovom metodom određuju ionizirane otopljene molekule korištenjem elektroda koje su prekondicionirane za ciljane molekule, a neosjetljive na neutralne molekule i neotopljene čestice, metoda bi mogla biti primjenjiva i na analizu nanokristala djelatne tvari.

Još jedna metoda koja se temelji na odjeljivanju otopljene i neotopljene tvari je dijaliza, koja se puno češće koristi za ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari nego topljivosti pa je stoga i opisana u idućem poglavlju.

4.3.7. *In vitro* metode za ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari iz oblika nanokristala

U slučajevima slabo topljivih djelatnih tvari (BCS klasa 2 i 4), topljivost i brzina oslobađanja djelatne tvari određuju brzinu apsorpcije. Metode za ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari uobičajeno se koriste za predviđanje bioraspoloživosti djelatne tvari jer se karakterizacijom proizvoda odgovarajućom metodom može utjecati na farmakokinetički odziv lijeka. Tijekom razvoja proizvoda generira se velik broj formulacija od kojih se samo na malom broju formulacija provode studije bioekvivalencije. Većina se razvojnih uzoraka testira metodama za ispitivanje brzine oslobađanja kako bi se procijenio utjecaj formulacijskih promjena na mehanizam oslobađanja djelatne tvari *in vivo*. Razvijene *in vitro* metode trebaju pokazivati dovoljno razlikovanje prema formulacijskim i procesnim varijacijama te biti ponovljive i dovoljno jednostavne za rutinsko provođenje analiza. Validacijom takvih metoda, one se nadalje koriste za osiguranje odgovarajuće kvalitete tijekom proizvodnje i skladištenja, razlikovanje dobrih i loših serija, kao i za usporedbu sličnosti različitih serija. Idealno bi metoda trebala vidjeti razlike u profilima oslobađanja koje odgovaraju *in vivo* razlikama,

uspostavljanjem *in vivo in vitro* korelacije/odnosa (IVIVC/R). Kako još uvijek ne postoje standardizirane aparature i procedure za ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari iz oblika nanokristala i ostalih nanočestica, *in vitro* oslobađanje se i dalje ispituje korištenjem uobičajenih aparatura (aparatura s lopaticama, košaricama i protočnim ćelijama), iako se sve češće koriste i metode dijalize, često i u kombinaciji s prethodno navedenim uobičajenim aparaturama.

Na brzinu oslobađanja utječe odabir aparature i agitacije, temperatura pri kojoj se provodi ispitivanje te topljivost u odabranom mediju i volumen medija. Izbor medija i volumena medija za ispitivanje brzine oslobađanja ovisi o topljivosti djelatne tvari, kao i o načinu primjene lijeka u obliku nanokristala. Dok za oralne dozirne oblike medij obično simulira pH gastrointestinalnog trakta i analize se provode pri 37°C, za terapijske nanosustave odabir medija i volumena medija, kao i temperature ovisi o mjestu primjene i mjestu djelovanja ljekovitog pripravka. Ispitivanje se obično provodi pri uvjetima u kojima su osigurani uvjeti topljivosti jer se na taj način osigurava da brzina i razmjer oslobađanja nisu ograničeni topljivošću lijeka (eng. *sink conditions*). Uvjeti topljivosti su osigurani ako je koncentracija lijeka 3 – 10 puta manja od topljivosti zasićene otopine (1).

Kod ispitivanja brzine oslobađanja djelatne tvari, kao i kod ispitivanja topljivosti, izazov predstavlja separacija otopljene od neotopljene djelatne tvari u obliku nanokristala, kao i pouzdana kvantifikacija, te se ispituju *in situ* metode kvantifikacije, objašnjene u prethodnom poglavlju 4.3.6 Topljivost.

4.3.7.1. Metode uzorkovanja i odjeljivanja

Metode uzorkovanja i odjeljivanja temelje se na unosu uzorka u medij za ispitivanje brzine oslobađanja, primjeni agitacije i uzorkovanju medija ili nanočestica u određenim vremenskim periodima. Najčešće se radi o korištenju aparature s košaricama ili lopaticama (USP aparatura 1 i 2), u 500 – 900 mL medija, pri brzini okretaja miješala 50 – 100 rpm i pri temperaturi od

37 °C ± 0.5 °C (94; 95; 96). Međutim, osim opisanih aparatura s lopaticama i košaricama, analize se često provode i na različitim izvedbama tresilica (97), pri čemu se onda koristi puno manji volumen (od nekoliko mililitara pa do par stotina mililitara). Uzorkovanje se provodi u određenim vremenskim intervalima, a uzorak se filtrira na filter odgovarajuće veličine pora ili centrifugira, a kvantifikacija djelatne tvari provodi se analizom filtrata ili supernatanta. Problem separacije otopljene tvari od neotopljenih čestica detaljno je već opisan u poglavlju 4.3.6 Topljivost. Juenemann i suradnici (98) su pokazali da se najbolje *in vitro* predviđanje *in vivo* učinka prije i nakon obroka postiže separacijom na filtre veličine pora 0.1 µm ili manje. Kod metoda koje se provode u farmakopejskim aparaturama, nadoknada uzorka termostatiranim medijem vrši se prema potrebi, dok se kod metoda koje se provode u tresilicama u malim volumenima, zbog niske topljivosti i brzog zasićenja, vrlo često mijenja cijeli volumen medija.

Konvencionalni pristup razvoju metodama za ispitivanje brzine oslobađanja temelji se na osiguranim uvjetima topljivosti, odnosno uvjetima u kojima je volumen medija za ispitivanje brzine oslobađanja najmanje tri puta veći od volumena potrebnog za potpuno otapanje najviše doze. Provođenjem analize pri tim uvjetima moguće je vidjeti razliku u brzini oslobađanja jer je oslobađanje djelatne tvari iz nanokristala gotovo trenutačno pri ovakvim uvjetima, dok je iz mikroniziranih sustava ipak nešto postupnije, ali inicijalni dio profila oslobađanja je vrlo sličan neovisno o veličini čestica. Međutim, već je u nekoliko primjera pokazano kako se smanjenjem uvjeta topljivosti na manje od tri može postići bolje razlikovanje kako mikrosuspenzija i nanosuspenzija, tako i nanosuspenzija različitih veličina čestica. Tako su Murdande i suradnici (85) ispitali brzinu oslobađanja mikrosuspenzije i nanosuspenzija griseofulvina istog kvalitativnog i kvantitativnog sastava. Suspenzije su se razlikovale samo po veličini čestica (11.3 µm, 362 nm i 122 nm). Ispitivanjem brzine oslobađanja pri uvjetima osigurane topljivosti profili oslobađanja dvije nanosuspenzije se međusobno nisu razlikovali,

dok je oslobađanje mikrosuspenzije u prvim točkama analize bilo jednako brzo kao i iz nanosuspenzija. Provođenjem analize pri uvjetima neosigurane topljivosti pokazala se bolja razliku u početnom dijelu profila oslobađanja između suspenzija različitih veličina čestica. Do sličnog zaključka o povećanju razlikovanja provođenjem analize nanosuspenzije paklitaksela pri uvjetima neosigurane topljivosti došli su i Patel i suradnici (64). Lui i suradnici (96) su čak pokazali da se najbolje razlikovanje metode postiže kada je koncentracija otopljene tvari jednaka koncentraciji zasićene otopine. Slabije razlikovanje, smanjenjem uvjeta topljivosti na manje od jedan, objašnjavaju brzim otapanjem malih čestica i zanemarivim utjecajem veći čestica na brzinu oslobađanja.

4.3.7.2. Metode s protočnim ćelijama

Kod metoda s protočnim ćelijama, uzorak se fiksira u ćeliju kroz koju protječe medij za ispitivanje brzine oslobađanja, a na izlazu iz ćelije se nalazi filter koji bi trebao onemogućiti prolaz neotopljenih čestica iz ćelije. Radi se o farmakopejskoj aparaturi (USP aparatura 4), a može biti konstruirana u otvorenoj ili zatvorenoj konfiguraciji. Ako se radi o otvorenoj konfiguraciji, kroz ćeliju s uzorkom protječe uvijek svježi medij, dok u zatvorenoj konfiguraciji uvijek ista količina medija cirkulira kroz sustav. Općenito, otvorena konfiguracija se koristi za analizu djelatnih tvari vrlo niske topljivosti jer je protokom svježeg medija moguće ostvariti uvjete osigurane topljivosti. Provođenje analize u ovoj konfiguraciji zahtjeva velike količine medija, pogotovo ako se radi o dugotrajnoj analizi.

Heng i suradnici (99) su procjenjivali različite metode ispitivanja brzine oslobađanja cefuroksim aksetila iz neobrađenog praška i nanopraška veličine čestica 300 nm. Koristili su aparaturu s košaricama i lopaticama, aparaturu s protočnim ćelijama u zatvorenoj konfiguraciji te aparaturu s vrećicama za dijalizu. Usporedbom omjera inicijalne brzine oslobađanja iz nanopripravka i neobrađene djelatne tvari s omjerom izračunatim prema

Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi (ovisno o specifičnoj površini čestica i zasićenoj topljivosti), došli su do zaključka da rezultati analize provedene u aparaturi s protočnim ćelijama najbolje koreliraju s izračunatim omjerom. Osim toga, ta metoda je jedina pokazala odgovarajuću mogućnost razlikovanja, dok se ostalim metodama nisu vidjele značajne razlike u brzini oslobađanja. U slučaju metoda s lopaticama i košaricama, to su objasnili slabijom močljivošću nanopraška, dok je kod metode s vrećicama za dijalizu, membrana predstavljala barijeru za otopljenu djelatnu tvar. Nadalje su Sievens-Figueroa i suradnici (100) ispitivanjem brzine oslobađanja nanokristalnog griseofulvina iz oralnog filma pokazali da je postignuta bolja mogućnost razlikovanja metoda koristeći aparaturu s protočnim ćelijama nego aparaturu s košaricama.

4.3.7.3. Metode dijalize

U metodama dijalize uzorak se smješta u donorski odjeljak, a medij za ispitivanje brzine oslobađanja u receptorski odjeljak. Donorski i receptorski odjeljak se fizički odvoje poroznom celuloznom membranom. Zbog otapanja djelatne tvari u donorskom odjeljku i razlike u koncentraciji stvara se difuzijski gradijent te molekule difundiraju u receptorski odjeljak. Veličina pora membrane za otopljene tvari izražava se *cut-off* vrijednošću molekulskih masa (MWCO), tj. vrijednošću molekulske mase iznad koje molekula ne može difundirati kroz membranu. Uobičajeno se koristi veličina pora deset puta veća od molekulske mase djelatne tvari kako membrana ne bi predstavljala prepreku difuziji otopljenog lijeka (101). Nadalje, kako bi otopljeni lijek mogao neometano difundirati, volumen vrećice za dijalizu bi trebao biti 10 – 100 puta manji od ukupnog volumena, ovisno o topljivosti analizirane djelatne tvari. Uvjeti osigurane topljivosti bi se trebali poštovati i unutar i izvan vrećice za dijalizu. S obzirom na smještanje uzorka, razlikuju se regularna i obrnuta dijaliza. U regularnoj dijalizi je donorski odjeljak vrećica za dijalizu, a uzorkuje se iz medija izvan vrećice (34; 102; 103; 60). U obrnutoj dijalizi uzorak se nalazi izvan vrećice za dijalizu, koja predstavlja receptorski

odjeljak iz kojeg se uzorkuje (104). Dijaliza se odvija u dva koraka: (i) prvi korak je otapanje djelatne tvari iz nanočestice i (ii) drugi korak je prijelaz preko membrane iz donorskog u receptorski odjeljak. Iako je očita prednost metode separacija neotopljene tvari membranom propusnom za otopljenu tvar, metode dijalize imaju i neke nedostatke koje ih čine nedovoljno predvidljivima za *in vivo* ponašanje. Unutar vrećice za dijalizu je agitacija loša, što može dovesti do agregacije i nižeg oslobađanja ako se uzorak unosi u vrećicu. Nadalje, ako je oslobađanje unutar vrećice jako brzo, tada je prijelaz preko membrane u stvari korak koji određuje brzinu oslobađanja, a ne samo otapanje iz formulacije, i pri tome može doći do narušavanja uvjeta topljivosti unutar vrećice. Ti se problemi mogu spriječiti reverznom dijalizom, kada se u odjeljku s uzorkom može postići dovoljna agitacija kako ne bi došlo do agregacije, a zbog velikog volumena donorskog odjeljka teško može doći do narušavanja uvjeta topljivosti. Međutim, nedostatak reverzne dijalize može biti gubitak uzorka rukovanjem vrećicom za dijalizu.

4.3.7.4. Kombinirane metode

Iako su u najvećem broju literaturnih navoda za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari iz nanokristala opisane metode uzorkovanja i odjeljivanja, bez obzira na zahtjevnost separacije otopljene i neotopljene tvari, za analizu suspenzija ili nanočestica uvode se kombinacije metoda, na primjer vrećice za dijalizu u kombinaciji sa službenim aparaturama s lopaticama, košaricama ili protočnim ćelijama. Tako su Kumar i suradnici (105) razvili metodu za analizu nanosuspenzije naproksena i indometacina, koristeći aparaturu s lopaticama u kombinaciji s vrećicom za dijalizu, fiksiranu u posudi posebno konstruiranim adapterom. Metoda je pokazala odgovarajuću mogućnost razlikovanja s obzirom na agregaciju čestica nanosuspenzija. Gao i suradnici (106) su suspenziju acetaminofena analizirali u aparaturi s protočnim ćelijama, koristeći vrećicu za dijalizu s adapterom. Bhardwaj i Burgess (107) su na primjeru liposoma deksametazona pokazali da metoda s

protočnim ćelijama s adaptiranim vrećicama za dijalizu pokazuje bolju mogućnost razlikovanja od metoda regularne i obrnute dijalize. Abdel-Mottaleb i Lamprecht (108) su modificirali aparaturu s košaricama na način da su košaricu zamijenili staklenim cilindrom s donje strane zatvorenim membranom za dijalizu, a odgovarajuću mogućnost razlikovanja metoda pokazali su analizom liposoma, polimernih i lipidnih nanočestica.

Topljivost i brzina oslobađanja su dva najvažnija svojstva nanokristala djelatne tvari koja određuju *in vivo* učinak i zbog toga metode kojima se ispituju moraju biti dobro razvijene. Tijekom razvoja metode za ispitivanje topljivosti važno je procijeniti potpunost separacije otopljene tvari od neotopljenih čestica. Kad se radi o odvajanju filtriranjem, neotopljene čestice mogu proći kroz pore filtera primjenom filtera neodgovarajuće veličine pora. Primjenom manjih filtera, može doći ili do začepjenja filtera, ali isto tako može doći i do prolaska neotopljenih čestica kroz pore jer se s vremenom neotopljenim česticama procesom otapanja smanjuje veličina čestica. S druge strane, i ultracentrifugiranje pri neodgovarajućim uvjetima može rezultirati lošom separacijom. Naime, neotopljene nanočestice su i dalje vrlo lagane i imaju tendenciju ostati suspendirane u mediju. Stoga je potrebno primijeniti veliku centrifugalnu silu kroz duže vrijeme za efikasno razdvajanje otopljene tvari od neotopljenih čestica. Nadalje, tijekom ispitivanja topljivosti može doći do promjene kristalnog oblika, pa konačni rezultati ne prikazuju topljivost forme od interesa. Stoga je vrlo važno, ako postoji mogućnost polimorfnih prijelaza tijekom određivanja topljivosti, ispitati kristalni oblik ostatka nakon provedene analize. Neovisno o primijenjenoj metodologiji, nedovoljna separacija ili neželjena kristalna pretvorba može dovesti najčešće do preuveličanih rezultata topljivosti, što nadalje istraživača može navesti na krive zaključke. *In situ* neinvazivnim metodama izbjegava se problem nepotpune separacije, ali prikladnost takvih metoda je do

sada pokazana na svega nekoliko primjera, i konvencionalni pristup je i dalje puno zastupljeniji u literaturi.

Razvoj metode za ispitivanje brzine oslobađanja između ostalog se temelji na podacima proizašlima iz ispitivanja topljivosti, pri čemu i dalje treba staviti naglasak na prikladnost separacije ili *in situ* kvantifikacije. Profilima oslobađanja generiranim prikladno razvijenom metodom trebale bi se vidjeti razlike za koje se očekuje da će imati učinak na *in vivo* djelotvornost, kao i razlike za koje je taj učinak potvrđen. Prvenstveno se to odnosi na veličinu nanokristala djelatne tvari i kristalno stanje te promjene navedenih parametara koje se mogu dogoditi tijekom skladištenja, ali i različitim promjenama u ljekovitom obliku ili postupku priprave.

5. ZAKLJUČAK

Nanokristali djelatne tvari se sastoje od djelatne tvari veličine čestica ispod 1 μm i minimalne količine stabilizatora (surfaktanta i/ili polimera), a nanosuspenzije su koloidne suspenzije nanokristala djelatne tvari u disperzijskom sredstvu. Smanjenjem veličine čestica na submikronsku razinu utječe se na kinetičku topljivost i brzinu oslobađanja, što je posljedica povećanja omjer površine čestice i njenog volumena, te na termodinamičku topljivost postizanjem stanja prezasićenosti. Osim poboljšane topljivosti, bitna značajka suspenzija nanokristala djelatne tvari je vrlo visok udio djelatne tvari u formulaciji, kao i svojstvo bioadhezivnosti. Ljekoviti pripravci koji sadrže nanokristale djelatne tvari su prikladni za oralnu, parenteralnu, okularnu i pulmonalnu primjenu, uz lokalno ili sistemsko djelovanje.

Nanokristali djelatne tvari se pripremaju metodama povećanja ili smanjenja veličine čestica djelatne tvari (eng. *bottom up* i *top down*) ili kombinacijom navedena dva pristupa. Odabir načina pripreme najviše ovisi o svojstvima djelatne tvari, kao što su topljivost u vodenim i organskim otapalima, lipofilnost ($\log P$) te fizikalna i kemijska stabilnost (sklonost promjeni kristalnog oblika ili razgradnji). Učinkovitost pripreme nanokristala djelatne tvari ovisi prvenstveno o odabiru odgovarajućeg stabilizatora (surfaktanta i/ili polimera) u prikladnoj koncentraciji. Stabilizacija nanokristala djelatne tvari može biti sterička i elektrostatska. Sterički stabilizatori djeluju tako da stvaraju fizičku barijeru između nanokristalnih čestica, adsorpcijom neionskih surfaktanata ili polimera na česticu hidrofobnim dijelom molekule, dok se hidrofilni dio pruža u medij. Elektrostatska stabilizacija se temelji na elektrostatskom odbijanju čestica istog naboja, a postiže se adsorpcijom anionskih surfaktanata hidrofobnim dijelom na nanokristalnu česticu.

U svrhu daljnjeg ugrađivanja u čvrste dozirne oblike poput tableta ili kapsula ili osiguravanja zadovoljavajuće stabilnosti, pripravljene nanosuspenzije se mogu prevesti u čvrsto stanje procesima sušenja raspršivanjem ili smrzavanjem, granulacije i peletelizacije. Kako bi se

nakon redispergiranja zadržala veličina čestica slična početnoj i na taj način osigurala *in vivo* djelotvornost i sigurnost primjene, tijekom procesa se dodaju nosači (šećeri, šećerni alkoholi ili polimeri).

Odabir stabilizatora utječe na fizikalnu stabilnost nanokristala djelatne tvari, a procesi kojima se opaža fizikalna nestabilnost su raslojavanje (sedimentacija ili izlučivanje na površinu (eng. *creaming*)), aglomeracija/agregacija, rast kristala (Ostwaldovo zrenje) i promjena kristalnog oblika. Metode kojima se navedeni procesi karakteriziraju uključuju ispitivanje:

- veličine čestica, distribucije veličine čestica i indeksa polidisperzije (DLS, DL, električno brojanje čestica),
- morfologije čestica (mikroskopske tehnike – optička mikroskopija, SEM, TEM, AFM),
- zeta potencijala (površinskog naboja čestice) (Laser Doppler elektroforeza),
- kristalnog oblika (DSC, XRD),
- sedimentacije (mjerenje volumena sedimentacije),
- topljivosti (metoda zasićene otopine uz kvantifikaciju djelatne tvari *in situ* ili uz prethodno odjeljivanje otopljene tvari od neotopljenih nanokristala djelatne tvar)
- brzine oslobađanja djelatne tvari (metode uzorkovanja i odjeljivanja, metode kontinuiranog protoka, metode dijalize i kombinirane metode).

Razvoj pouzdanih i prikladnih metoda za karakterizaciju djelatnih tvari u obliku nanokristala, neizostavan su dio razvoja farmaceutskog proizvoda s nanokristalima djelatne tvari kako bi se osigurala kvaliteta proizvoda u postupku priprave i tijekom skladištenja te poboljšala *in vivo* učinkovitost.

6. LITERATURA

1. **Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR.** A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-420.
2. **Dressman JB, Thelen K, Jantratid E.** Towards Quantitative prediction of Oral Drug Absorption. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(10):655-667. str. 47(10):655-667.
3. **Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJ.** Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):315-499.
4. **Buckton G, Beezer AE.** The relationship between particle size and solubility. *Int J Pharm.* 1992;82(3):R7-R10.
5. **Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y.** Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(7):631-644.
6. **Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X.** Drug nanocrystals: In vivo performances. *J Control Release.* 2012;160(3):418-430.
7. **Müller RH, Jacobs C.** Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *Int J Pharm.* 2002;237(1-2):151-161.
8. **Romero GB, Keck CM, Müller RH, Bou-Chacra NA.** Development of cationic nanocrystals for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;107:215-222.
9. **Rabinow BE.** Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):785-796.
10. **Möschwitzer JP.** Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 2013;453(1):142-156.
11. **Liversidge GG, Cundy KC.** Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm.* 1995;125(1):91-97.
12. **Butler JM, Dressman JB.** The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci.* 2010;99(12):4940-4954.
13. **Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T.** Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 2006;111(1-2):56-64.
14. **Quinn K, Gullapalli RP, Merisko-Liversidge E, Goldbach E, Wong A, Liversidge GG, Hoffman W, Sauer JM, Bullock J, Tonn G.** A formulation strategy for gamma

secretase inhibitor ELND006, a BCS class II compound: development of a nanosuspension formulation with improved oral bioavailability and reduced food effects in dogs. *J Pharm Sci.* 2012;101(4):1462-1474.

15. **Deschamps B, Musaji N, Gillespie JA.** Food effect on the bioavailability of two distinct formulations of megestrol acetate oral suspension. *Int J Nanomedicine.* 2009;4:185-192.

16. **Bajaj A, Rao MR, Pardeshi A, Sali D.** Nanocrystallization by evaporative antisolvent technique for solubility and bioavailability enhancement of telmisartan. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(4):1331-1340.

17. **Hou Y, Shao J, Fu Q, Li J, Sun J, He Z.** Spray-dried nanocrystals for a highly hydrophobic drug: Increased drug loading, enhanced redispersity, and improved oral bioavailability. *Int J Pharm.* 2017;516(1-2):372-379.

18. **Jiang T, Han N, Zhao B, Xie Y, Wang S.** Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of simvastatin nanocrystal prepared by sonoprecipitation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(10):1230-1239.

19. **Ochi M, Kawachi T, Toita E, Hashimoto I, Yuminoki K, Onoue S, Hashimoto N.** Development of nanocrystal formulation of meloxicam with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors. *Int J Pharm.* 2014;474(1-2):151-156.

20. **Zhang J, Huang Y, Liu D, Gao Y, Qian S.** Preparation of apigenin nanocrystals using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(4-5):740-747.

21. **Lui F, Park JY, Zhang Y, Conwell C, Liu Y, Bathula SR, Huang L.** Targetted cancer therapy with novel high drug loading nanocrystals. *J Pharm Sci.* 2010;99:3542-3551.

22. **Ahuja M, Verma P, Bhatia M.** Preparation and evaluation of chitosan–itraconazole co-precipitated nanosuspension for ocular delivery. *J Exp Nanosci.* 2015;10(3):209–221.

23. **Zhang Y, Zhang J.** Preparation of budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: Characterization, in vitro release and in vivo lung distribution studies. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(1):285-289 .

24. **Müller RH, Gohla S, Keck CM.** State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(1):1-9.

25. Food and Drug Administration (FDA):Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, June 2014 Available at: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm> Accesed January 12, 2017.

26. Food and Drug Administration (FDA): Nanotechnology Task Force Report 2007 Available at:

<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm2006659.htm>
Accessed January 12, 2017. .

27. **Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP.** Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm.* 2013;453(1):126-141.
28. **Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Durriegl M, Perina Lakoš G, Pepić I.** Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farmaceutski glasnik.* 2015;71:7-8.
29. **Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P.** Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm.* 2008;364(1):64-75.
30. **Kumar S, Burgess DJ.** Nanosuspensions. U Wright J, Burgess DJ, ur. Long acting injections and implants. Burgess. CRS Press, Springer. Chapter 13, 2012;239-261.
31. **Hao J, Gao Y, Zhao J, Zhang J, Li Q, Zhao Z, Liu J.** Preparation and optimization of resveratrol nanosuspensions by antisolvent precipitation using Box-Behnken design. *AAPS PharmSciTech.* 2015;16(1):118-128.
32. **Hashem FM, Al-Sawahli MM, Nasr M, Ahmed OA.** Custom fractional factorial designs to develop atorvastatin self-nanoemulsifying and nanosuspension delivery systems- enhancement of oral bioavailability. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3141-3152.
33. **Mohyeldin SM, Mehanna MM, Elgindy NA.** The relevancy of controlled nanocrystallization on rifampicin characteristics and cytotoxicity. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2209-2222.
34. **Sahu BP, Das MK.** Nanoprecipitation with sonication for enhancement of oral bioavailability of furosemide. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(1):129-137.
35. **Zu Y, Li N, Zhao X, Li Y, Ge Y, Wang W, Wang K, Liu Y.** In vitro dissolution enhancement of micronized l-nimodipine by antisolvent re-crystallization from its crystal form H. *Int J Pharm.* 2014;464(1-2):1-9.
36. **Chiou H, Li L, Hu T, Chan HK, Chen JF, Yun J.** Production of salbutamol sulfate for inhalation by high-gravity controlled antisolvent precipitation. *Int J Pharm.* 2007;331(1):93-98.
37. **Esfandi E', Ramezani V, Vatanara A, Rouholamini Najafabadi A, Hadipour Moghaddam SP.** Clarithromycin dissolution enhancement by preparation of aqueous nanosuspensions using sonoprecipitation technique. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(3):809-818.
38. **Zhua WZ, Wang JX, Shao L, Zhang H, Zhang Q, Chen JF.** Liquid antisolvent preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles in a tube-in-tube microchannel reactor. *Int J Pharm.* 2010; 395(1-2):260-265.

39. **Tran TT, Tran PH, Nguyen MN i sur.** Amorphous isradipine nanosuspension by the sonoprecipitation method. *Int J Pharm.* 2014; 474(1-2):146-150.
40. **Dhumal RS, Biradar SV, Yamamura S, Paradkar AR, York P.** Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by sonoprecipitation for enhancement of bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(1):109-115.
41. **Gao L, Liu G, Wang X, Liu F, Xu Y, Ma J.** Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *Int J Pharm.* 2011;404(1-2):231-237.
42. **Asghari I, Esmailzadeh F.** Formation of ultrafine deferasirox particles via rapid expansion of supercritical solution (RESS process) using Taguchi approach. *Int J Pharm.* 2012;433(1-2):149-156.
43. **Anwar M, Ahmad I, Warsi MH, Mohapatra S, Ahmad N, Akhter S, Ali A, Ahmad FJ.** Experimental investigation and oral bioavailability enhancement of nano-sized curcumin by using supercritical anti-solvent process. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:162-172.
44. **Thakur R, Gupta RB.** Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. *Int J Pharm.* 2006;308(1-2):190-199.
45. **Tozuka Y, Miyazaki Y, Takeuchi H.** A combinational supercritical CO₂ system for nanoparticle preparation of indomethacin. *Int J Pharm.* 2010;386(1-2):243-248.
46. **Baba K, Nishida K.** Calpain inhibitor nanocrystals prepared using Nano Spray Dryer B-90. *Nanoscale Res Lett.* 2012; 7(1):436.
47. **Baba K, Nishida K.** Steroid nanocrystals prepared using the nano spray dryer B-90. *Pharmaceutics.* 2013; 5(1):107-114.
48. **de Waard H, Hinrichs WL, Frijlink HW.** A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: controlled crystallization during freeze-drying. *J Control Release.* 2008;128(2):179-183 .
49. **Kumar S, Burgess DJ.** Wet milling induced physical and chemical instabilities of naproxen nano-crystalline suspensions. *Int J Pharm.* 2014;466(1-2):223-232.
50. **Ahuja BK, Jena SK, Paidi SK, Bagri S, Suresh S.** Formulation, optimization and in vitro-in vivo evaluation of febuxostat nanosuspension. *Int J Pharm.* 2015;478(2):540-552.
51. **Guo Y, Wang Y, Xu L.** Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015;10(3)223-229.
52. **Karakucuk A, Celebi N, Teksin ZS.** Preparation of ritonavir nanosuspensions by microfluidization using polymeric stabilizers: I. A Design of Experiment approach. *Eur J Pharm Sci.* 2016;95:111-121.

53. **Seok SH, Kang SY, Seo JW, Kim SH, Hwang KM, Park ES.** Formulation of Nanoparticle Containing Everolimus Using Microfluidization and Freeze-Drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2016;64(10):1445-1449.
54. **Al Shaal L, Shegokar R, Müller RH.** Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation. *Int J Pharm*. 2011;420(1):133-140.
55. **Romero GB, Chen R, Keck CM, Müller RH.** Industrial concentrates of dermal hesperidin smartCrystals®--production, characterization & long-term stability. *Int J Pharm*. 2015;482(1-2):54-60.
56. **Soliman KA, Ibrahim HK, Ghorab MM.** Effects of different combinations of nanocrystallization technologies on avanafil nanoparticles: in vitro, in vivo and stability evaluation. *Int J Pharm*. 2016;517(1-2):148-156.
57. **Thadkala K, Nanam PK, Rambabu B, Sailu C, Aukunuru J.** Preparation and characterization of amorphous ezetimibe nanosuspensions intended for enhancement of oral bioavailability. *Int J Pharm Investig*. 2014;4(3):131-137.
58. **Bose S, Schenck D, Ghosh I, Hollywood A, Maulit E, Ruegger C.** Application of spray granulation for conversion of a nanosuspension into a dry powder form. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47(1):35-43.
59. **Figuerola CE, Bose S.** Spray granulation: importance of process parameters on in vitro and in vivo behavior of dried nanosuspensions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt B):1046-1055.
60. **Li Y, Zhao X, Zu Y, Zhang Y.** Preparation and characterization of paclitaxel nanosuspension using novel emulsification method by combining high speed homogenizer and high pressure homogenization. *Int J Pharm*. 2015;490(1-2):324-333.
61. **Hong C, Dang Y, Lin G, Yao Y, Li G, Ji G, Shen H, Xie Y.** Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: an in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2014;477(1-2):251-260.
62. **Sarnes A, Kovalainen M, Häkkinen MR, Laaksonen T, Laru J, Kiesvaara J, Ilkka J, Oksala O, Rönkkö S, Järvinen K, Hirvonen J, Peltonen L.** Nanocrystal-based per-oral itraconazole delivery: superior in vitro dissolution enhancement versus Sporanox® is not realized in in vivo drug absorption. *J Control Release*. 2014;180:109-116.
63. **Zuo B, Sun Y, Li H, Liu X, Zhai Y, Sun J, He Z.** Preparation and in vitro/in vivo evaluation of fenofibrate nanocrystals. *Int J Pharm*. 2013;455(1-2):267-275.
64. **Patel K, Patil A, Mehta M, Gota V, Vavia P.** Oral delivery of paclitaxel nanocrystal (PNC) with a dual Pgp-CYP3A4 inhibitor: preparation, characterization and antitumor activity. *Int J Pharm*. 2014;472(1-2):214-223.

65. **Lee J, Lee SJ, Choi JY, Yoo JY, Ahn CH.** Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):441-449.
66. **Wu L, Zhang J, Watanabe W.** Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):456-469.
67. **Nakach M, Authelin JR, Tadros T, Galet L, Chamayou A.** Engineering of nano-crystalline drug suspensions: employing a physico-chemistry based stabilizer selection methodology or approach. *Int J Pharm.* 2014;476(1-2):277-288.
68. **George M, Ghosh I.** Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(1-2):142-152.
69. **Lestari ML, Müller RH, Möschwitzer JP.** Systematic screening of different surface modifiers for the production of physically stable nanosuspensions. *J Pharm Sci.* 2015;104(3):1128-1140.
70. **Cerdeira AM, Mazzotti M, Gander B.** Formulation and drying of miconazole and itraconazole nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2013;443(1-2):209-220.
71. **Verma S, Gokhale R, Burgess DJ.** A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2009;380(1-2):216-222.
72. **Cerdeira AM, Werner IA, Mazzotti M, Gander B.** Simultaneous quantification of polymeric and surface active stabilizers of nanosuspensions by using near-infrared spectroscopy. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(11):1360-1370 .
73. **Verma S, Huey BD, Burgess DJ.** Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection. *Langmuir.* 2009;25(21):12481-12487.
74. **Van Eerdenbrugh B, Vercruysse S, Martens JA, Vermant J, Froyen L, Van Humbeeck J, Van den Mooter G, Augustijns P.** Microcrystalline cellulose, a useful alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions - a case study with itraconazole. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(2):590-596.
75. **Kumar S, Gokhale R, Burgess DJ.** Sugars as bulking agents to prevent nano-crystal aggregation during spray or freeze-drying. *Int J Pharm.* 2014;471(1-2):303-311.
76. **Van Eerdenbrugh B, Froyen L, Van Humbeeck J, Martens JA, Augustijns P, Van den Mooter G.** Drying of crystalline drug nanosuspensions-the importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. *Eur J Pharm Sci.* 2008;35(1-2):127-135 .

77. **Malamatari M, Somavarapu S, Bloxham M, Buckton G.** Nanoparticle agglomerates of indomethacin: The role of poloxamers and matrix former on their dissolution and aerosolisation efficiency. *Int J Pharm.* 2015;495(1):516-526.
78. **Dong Y, Ng WK, Hu J, Shen S, Tan RB.** Clay as a matrix former for spray drying of drug nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2014;465(1-2):83-89.
79. **Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D.** Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release.* 2013;172(3):1126-1141.
80. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes (Technical Note) Available at <https://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction> Accessed December 31, 2017.
81. **Clas SD, Dalton CR, Hancock BC.** Differential scanning calorimetry: applications in drug development, *PSTT.* 1999;2(8):311-320.
82. **Newman A.** X-ray Powder Diffraction in Solid Form Screening and Selection. *Am. Pharm. Rev.* 2011;14,44-46,48-51.
83. **Shah DA, Murdande SB, Dave RH.** A Review: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspect of Nanocrystalline Suspensions. *J Pharm Sci.* 2016;105(1):10-24.
84. **Jünemann D, Dressman JB.** Analytical methods for dissolution testing of nanosized drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(7):931-943.
85. **Murdande SB, Shah DA, Dave RH.** Impact of nanosizing on solubility and dissolution rate of poorly soluble pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2015;104(6):2094-2102.
86. **Van Eerdenbrugh B, Alonzo DE, Taylor LS.** Influence of particle size on the ultraviolet spectrum of particulate-containing solutions: implications for in-situ concentration monitoring using UV/Vis fiber-optic probes. *Pharm Res.* 2011;28(7):1643-1652.
87. **Van Eerdenbrugh B, Vermant J, Martens JA, Froyen L, Humbeeck JV, Van den Mooter G, Augustijns P.** Solubility increases associated with crystalline drug nanoparticles: methodologies and significance. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1858-1870 .
88. **Anhalt K, Geissler S, Harms M, Weigandt M, Fricker G.** Development of a new method to assess nanocrystal dissolution based on light scattering. *Pharm Res.* 2012;29(10):2887-2901.
89. **Kayaert P, Li B, Jimidar I, Rombaut P, Ahssini F, Van den Mooter G.** Solution calorimetry as an alternative approach for dissolution testing of nanosuspensions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(3):507-513.
90. **Wallace SJ, Li J, Nation RL, Boyd BJ.** Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Deliv Transl Res.* 2012;2(4):284-292 .

91. **Bohets H, Vanhoutte K, De Maesschalck R, Cockaerts P, Vissers B, Nagels LJ.** Development of in situ ion selective sensors for dissolution. *Anal Chim Acta*. 2007;581(1):181-191.
92. **Peeters K, De Maesschalck R, Bohets H, Vanhoutte K, Nagels L.** In situ dissolution testing using potentiometric sensors. *Eur J Pharm Sci*. 2008;34(4-5):243-249.
93. **Juenemann D, Bohets H, Ozdemir M, de Maesschalck R, Vanhoutte K, Peeters K, Nagels L, Dressman JB.** Online monitoring of dissolution tests using dedicated potentiometric sensors in biorelevant media. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(1):158-165 .
94. **Nanjwade BK, Derkar GK, Bechra HM, Nanjwade VK, Manvi FV.** Design and Characterization of Nanocrystals of Lovastatin for Solubility and Dissolution Enhancement. *J Nanomedic Nanotechnol*. 2011;2(2):107.
95. **Chen C, Wang L, Cao F, Miao X, Chen T, Chang Q, Zheng Y.** Formulation of 20(S)-protopanaxadiol nanocrystals to improve oral bioavailability and brain delivery. *Int J Pharm*. 2016;497(1-2):239-247.
96. **Liu P, De Wulf O, Laru J, Heikkilä T, van Veen B, Kiesvaara J, Hirvonen J, Peltonen L, Laaksonen T.** Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):748-756.
97. **Noh JK, Naeem M, Cao J, Lee EH, Kim MS, Jung Y, Yoo JW.** Herceptin-functionalized pure paclitaxel nanocrystals for enhanced delivery to HER2-positive breast cancer cells. *Int J Pharm*. 2016;513(1-2):543-553.
98. **Juenemann D, Jantratid E, Wagner C, Reppas C, Vertzoni M, Dressman JB.** Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(2):257-264 .
99. **Heng D, Cutler DJ, Chan HK, Yun J, Raper JA.** What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharm Res*. 2008;25(7):1696-1701.
100. **Sievens-Figueroa L, Pandya N, Bhakay A, Keyvan G, Michniak-Kohn B, Bilgili E, Davé RN.** Using USP I and USP IV for discriminating dissolution rates of nano- and microparticle-loaded pharmaceutical strip-films. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(4):1473-1482 .
101. **Kastellorizios M, Burgess DJ.** In Vitro Drug Release Testing and In Vivo/In Vitro. U Wright J, Burgess DJ, ur. Long acting injections and implants. Burgess. CRS Press, Springer. Chapter 23, 2012;475-504.
102. **Han M, Liu X, Guo Y, Wang Y, Wang X.** Preparation, characterization, biodistribution and antitumor efficacy of hydroxycamptothecin nanosuspensions. *Int J Pharm*. 2013;455(1-2):85-92.

103. **He S, Yang H, Zhang R, Li Y, Duan L.** Preparation and in vitro-in vivo evaluation of teniposide nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2015;478(1):131-137.
104. **Chidambaram N1, Burgess DJ.** A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. *AAPS PharmSci.* 1999;1(3):E11.
105. **Kumar S, Xu X, Gokhale R, Burgess DJ.** Formulation parameters of crystalline nanosuspensions on spray drying processing: a DoE approach. *Int J Pharm.* 2014;464(1-2):34-45.
106. **Gao Z, Westenberger B.** Dissolution testing of acetaminophen suspension using dialysis adapter in flow-through apparatus: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(3):944-948.
107. **Bhardwaj U, Burgess DJ.** A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *Int J Pharm.* 2010;388(1-2):287-294.
108. **Abdel-Mottaleb MM, Lamprecht A.** Standardized in vitro drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus I. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(2):178-184.
109. **Kakran M, Shegokar R, Sahoo NG, Shaal LA, Li L, Müller RH.** Fabrication of quercetin nanocrystals: comparison of different methods. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(1):113-121.